



TITLE:

# 京都大学再生医科学研究所年報 2013

AUTHOR(S):

---

CITATION:

京都大学再生医科学研究所年報 2013. 京都大学再生医科学研究所年報  
2014, 16

ISSUE DATE:

2014-06-20

URL:

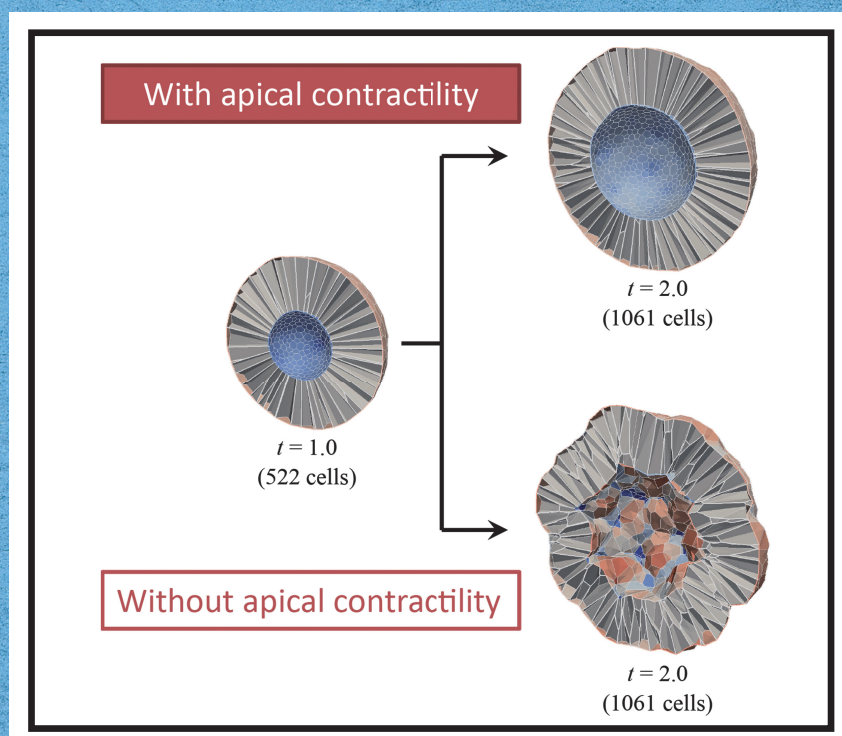
<http://hdl.handle.net/2433/193694>

RIGHT:



京都大学

## 再生医科学研究所年報

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences  
Kyoto University

〈第16巻〉

2013  
平成25年



## 表紙写真

「多細胞組織の形態形成シミュレーション」

成長する球殻形状をした上皮組織の断面図。内腔側に細胞頂端面を有する組織( $t=1$ )が、細胞分裂により成長するとき( $t=2$ )、組織内には細胞同士の押し合う力が生じる。頂端面側の収縮性がない場合(without apical contractility)、細胞同士の押し合う力によって、組織は不規則な凸凹を有する形状となる。一方、頂端面に収縮性がある場合(with apical contractility)、頂端面側には引張力が作用するため、不規則な凸凹が抑えられ、組織は滑らかな表面を有する形状となる。







# 1. 巻 頭 言

## イノベーション

研究所長としての職務もあり文部科学省からの書類に目を通すことが多くなりました。その書類の中に「イノベーション(innovation)」という単語をよく見かけます。個人的にも戦略的イノベーション創出推進プログラム(S-イノベ)をプログラム・オフィサー(PO)としてお話し、また、革新的イノベーション創出プログラム(COI STREAM)に申請もしましたので、「イノベーション」とは何を意味しているかを考える機会がありました。

イノベーションの実例をあげてみますと、「プランクの黒体放射の説明」と「DNAの二重らせんモデル」はその最たるものでしょう。その後、量子力学と分子生物学の広大な学問領域が開けました。COI STREAMの申請書を書いているときに、「ここに書いてあることのどこにもイノベーションはない。」と松本総長から手厳しいご批判をいただきました。「プランクの黒体放射の説明」に相当する「イノベーション」を提案するなど、自分の能力を超えることを要求されても困ると途方に暮れていると、「卑近な例だが、コンビニや宅急便も立派なイノベーションだ。斬新なビジネスモデルの提案があると、多くの人たちが寄って集って改良を加え、ヒトの生活スタイルが大きく変わっただろう。」と言われました。「イノベーション」とは学問的な立派さとは異なる次元の言葉の様です。

私自身の40年近くの研究生生活を振り返ってみて、身近にイノベーションを実感できたのはわずか2回しかなかったように思います。1回目は博士課程の最終学年のときです。当時は脳動脈瘤や脳動静脈奇形の外科的な治療は開頭術しかありませんでしたが、当時脳神経外科の大学院生であった滝さん(三重大学名誉教授)に「脳血管障害をカテーテルで血管の内側から治療しようと思うから、カテーテルを作ってくれ。」と依頼されました。その後、多くの会社が参入してきて優れたデバイスが多く開発されて、現在では脳動脈瘤や脳動静脈奇形の半数以上、世界で年間10万人以上の患者が血管内手術で治療されるようになりました。もう一つは、山中教授によるiPS細胞の作製です。2006年にiPS細胞の第一報が報告され、2013年にはiPS細胞関連の論文がPubMedによると1600以上発表されました。まさしく一大イノベーションです。

このように、閉塞状況にあるときに誰かが一点風穴を開けると、多数の人がその風穴になだれ込み瞬く間に別世界が開ける—この一点の風穴を開けることが「イノベーション」なのだと思います。また、少しわかりにくくなってきましたので、「国境の長いトンネルを抜けると雪国であった。」(川端康成)をイメージすると「イノベーション」が良く理解できるのではないのでしょうか。若い人にとっては、玄人が高く評価する論理的な思考に基づいた研究を実行することは重要なことですが、たまには、少し脱線して「イノベーションを生み出す」ことにチャレンジしてみるのも楽しいと思います。

再生医科学研究所長 岩田 博夫



## 2. 京都大学再生医科学研究所概要

### 2-1 沿革

本研究所は、平成10年4月9日に設置された。その前身である胸部疾患研究所は、昭和16年3月に「結核の予防及び治療」を主軸とする結核研究所として設置され、昭和42年6月には結核胸部疾患研究所に名称変更、さらに昭和63年4月には「胸部疾患に関する学理及びその応用の研究」を目的とした胸部疾患研究所への全面改組が行われたが、胸部疾患に関する研究・治療を取り巻く社会的要請の変化から、胸部疾患研究所は57年間にわたる使命を終え、平成10年度より、同研究所基礎系分野及び臨床系分野の一部を人工臓器の研究・開発に関して顕著な業績を挙げてきた生体医療工学研究センターと統合し、さらに実地臨床医学を行う医学研究科との協力により、「生体組織及び臓器の再生に関する学理及びその応用の研究」を目的とする再生医科学研究所に改組・転換された。

改組・転換に伴い、胸部疾患研究所の臨床系分野の一部と研究所附属病院は、大学院医学研究科・医学部並びに医学部附属病院へとそれぞれ引き継がれた。

本研究所は、平成10年4月の発足時は5大研究部門と附属再生実験動物施設で組織された。その後、平成14年4月に附属幹細胞医学研究センターが設置され、平成16年4月に研究部門の再編(1大研究部門減)の実施によりナノ再生医工学研究センターが設置された。平成16年10月には、住友電気工業(株)の寄附による寄附研究部門が4年間の時限で設置された。現在4大研究部門(生体機能学、生体組織工学、再生統御学、再生医学応用)、3附属施設となっている。平成17年10月から平成22年3月まで、工学研究科、医学研究科とともに、ナノメディシン融合教育ユニットに参加した。

本研究所は、生命科学、医学、工学などの研究者が結集して再生医学の学際的基礎研究を推し進め、その成果の医学応用をめざすとともに、ヒトES細胞株の樹立機関として、樹立・特性解析を行ったES細胞を、全国の研究機関へ分配するナショナルバイオリソース事業を実施している。

また平成20年10月には共同利用・共同研究拠点の認定を文部科学大臣より受け、再生医学・再生医療に関する共同研究を実施している。

主な建物は、再生医科学研究所西館、再生医科学研究所東館(旧生体医療工学研究センター)、幹細胞医学研究棟(平成14年竣工)、南部総合研究実験棟(ウイルス研、医学研究科との3部局合同使用)(平成14年竣工)の4棟となっている。

### 2-2 教員数等

#### (1) 教 員 (平成26年1月1日現在)

現 員	教 授	准教授	講 師	助 教	小 計	特任講師	特任助教	合 計
	13(4)	8(2)	2	11	34(6)	1	1	36(6)

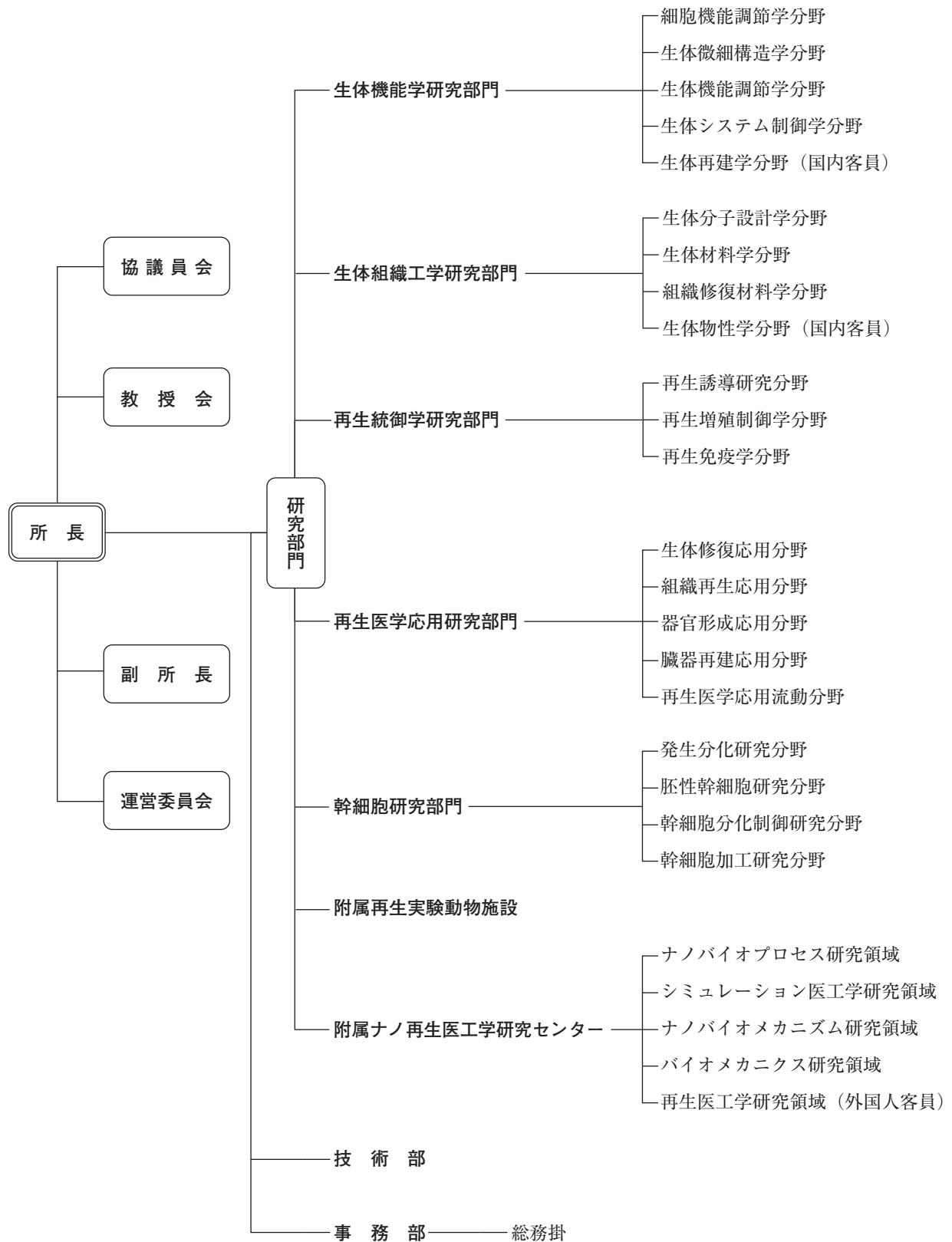
( ) 内は客員で外数

#### (2) 大学院生・研修員・研究生等 (平成26年1月1日現在)

大 学 院 生	研 修 員	研 究 生	外国人共同研究者等
84	4	6	2

## 2-3 組織図

(平成 26 年 1 月 1 日現在)





### 3. 研究概要と研究業績

#### 生体機能学研究部門

##### 細胞機能調節学分野

##### Department of Molecular and Cellular Biology

准教授 細川 暢子

Assoc. Prof. Nobuko Hosokawa

#### 【研究概要】

細胞機能調節学分野では、以下の4つのグループで研究を進めている。

#### 1. タンパク質品質管理機構の研究：小胞体におけるタンパク質の生合成と分解

細胞機能調節学分野・細川 G では、分子シャペロンタンパク質やレクチンの機能解析を中心に、再生現象の分子基盤とも言うべきタンパク質の生合成・再生・品質管理の機構について研究を進めている。

細胞内で生合成されたタンパク質は、正しい高次構造を取ってはいじめて機能することができる。タンパク質が正しい高次構造を形成するためには、分子シャペロンタンパク質の介助が必要であること、また生合成の過程でしばしばタンパク質は高次構造形成に失敗する事が明らかになってきた。ミスフォールドしたタンパク質は、再度フォールディング・サイクルに入るか、場合によっては細胞内分解される必要がある。このように、正しい高次構造をもったタンパク質を生合成・再生し、ミスフォールドしたタンパク質を処理するメカニズムは、タンパク質の品質管理機構と呼ばれている。小胞体では、多くの分泌タンパク質や膜タンパク質の生合成が行われており、これらのタンパク質の高次構造形成は小胞体品質管理機構(ERQC: endoplasmic reticulum quality control)によって担われている。小胞体内でミスフォールドしたタンパク質はサイトゾルへ引き出された後、ユビキチン-プロテアソーム系で分解され、この機構は小胞体関連分解(ERAD: endoplasmic reticulum-associated degradation)と呼ばれている。私たちは、ERQC および ERAD の作用機序の解明を、細胞、分子ならびに個体レベルで行っている。このメカニズムは、遺伝子レベルで変異をもったタンパク質が ERAD 機構によって分解されたり、あるいは ERQC の破綻が糖尿病や神経変性疾患などさまざまな疾患を引き起こすことが明らかにされ、病態解明や疾病治療の面からも注目されている。また、小胞体で生合成されるタンパク質の多くは N 結合型糖鎖をもった糖タンパク質であり、従って小胞体品質管理においては、糖鎖のトリミングと、特定の構造をもった糖鎖を認識するレクチンが、タンパク質のフォールディングや分解を制御することが知られている。

私たちは、哺乳類小胞体に存在する分子シャペロンタンパク質やレクチン、酵素、小胞体膜上に存在するユビキチンリガーゼ複合体などのタンパク質品質管理に関わる分子を中心に研究を進めている。

小胞体内腔でミスフォールドしたタンパク質は、小胞体から細胞質に逆行輸送された後にプロテアソームで分解されるが、タンパク質が小胞体膜を通過する機序は十分解明されていない。小胞体膜上には、分解基質をユビキチン化するユビキチンリガーゼ HRD1 が存在し、SEL1L タンパク質と結合して複合体を形成する(図 1)。この HRD1-

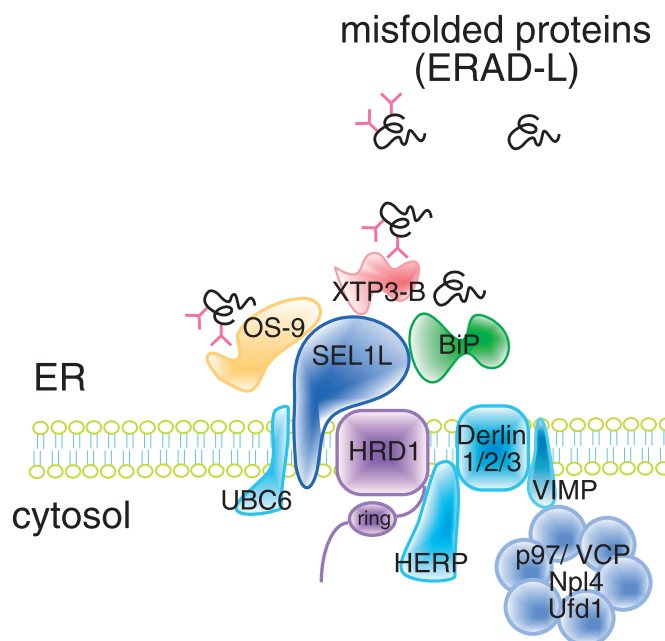


図1 哺乳類小胞体膜に存在する ERAD 複合体

小胞体膜には、ユビキチンリガーゼ HRD1 を中心に ERAD を調節する様々な分子が集めた大きな複合体が形成される。小胞体内腔に大きなドメインを持つ SEL1L タンパク質は、小胞体シャペロンタンパク質やレクチンと結合する。ヒト SEL1L は不安定なタンパク質で速やかな細胞内分解を受けるが、HRD1 タンパク質と結合することによって、安定に存在することができる。

**Figure1 A large ERAD complex on the mammalian ER membrane**

In the mammalian ER, a membrane-embedded ubiquitin ligase HRD1 forms a stoichiometric complex with SEL1L, and a large complex is formed by the association of various ERAD components. SEL1L is an unstable protein, which is stabilized by the association with HRD1.

SEL1L 複合体を中心に、小胞体内腔での基質認識、細胞質での分解に関与する様々な因子が集まって、非常に大きな膜複合体を形成している。SEL1L タンパク質は、小胞体内腔に大きなドメインを持ち、小胞体シャペロンタンパク質やレクチンと結合し、ミスフォールドした基質の受け渡しを行っている。哺乳類細胞では SEL1L タンパク質は不安定で、細胞内で速やかな分解を受けるが、HRD1 タンパク質と結合することによって安定に存在することができる。タンパク質の生合成と分解の速度を調節することによって、細胞機能を保つ仕組みの一つであると考えられる。本年度私たちは、ヒト培養細胞を用いて、HRD1-SEL1L 複合体の安定性と基質の逆行輸送に関わる領域の同定を行った。また、小胞体ストレスによって発現が誘導されてくる遺伝子の機能解析も進めている。

(文責：細川)

## 2. 病理性タンパク質凝集体：その規則正しい形成と構造の平衡

現在めまぐるしい進展が期待されている再生医療において重要なターゲットの一つであるパーキンソン病の多くは、タンパク質が凝集し蓄積することにより引き起こされる。他にも、タンパク質凝集性疾患の著名な例として、アルツハイマー病、ハンチントン病などが挙げられる。タンパク質が凝集するということは、家族性変異などを原因としてタンパク質が正しく折りたためないということを意味し、また凝集体が蓄積するという事は、それらが正しく分解を受けないということを意味する。これらタンパク質の凝集体形成とその細胞内での病原性を詳細に理解する事が私の研究目的である。

私が近年研究対象として来たアンチトリプシン欠損症は、遺伝性タンパク質凝集疾患の一つとして特に欧米で患者が多く(有名な Z 変異は Caucasian の 4% が heterozygote, 0.1% が homozygote として保持, ちなみに Mongol-



oid ではレアな変異), 細胞内でのアンチトリプシン蓄積が肝臓疾患を, 血中でのアンチトリプシン欠乏が肺気腫を引き起こす。アンチトリプシンがどのように凝集体を形成するのかについて, X 線結晶構造解析をベースとし検討を行なった結果, アンチトリプシンは単一のタンパク質でありながら, 少なくとも 3 種類のメカニズムで凝集する事が明らかとなった。興味深い事に, 各分子はまるでパズルを完成するごとく, その分子構造の一部を隣の分子と交換し合うことで天然構造に似通った凝集体構造の形成を実現していた。その構造としての異常性の欠如は, なぜ凝集体が細胞内で小胞体ストレスを引き起こさず安定に蓄積することができるかを物語っている様に思えた。さらに明らかになった事は, そのうち 1 つの凝集体が実際の肝硬変を引き起こした患者の細胞内凝集体に良く蓄積していた事である。これは凝集体のメカニズムに反応特異性のある抗体によって確かめられた。そして細胞実験によると, 他の凝集体は分解を受ける, または分泌されるようであった。つまり, 細胞内では数種の凝集体が平衡状態で存在するであろうが, そのうち特定の凝集体のみが疾患に関わる, すなわち病原性を持つということである。また最近, 各々の凝集体構造も時間により変調する事がわかってきた。つまりタンパク質としての毒性も変調する可能性があるということである。今後は(1)このような動的な凝集体構造の形成が細胞の恒常性にどのように影響を与えているか, (2)一番高い病原性はどの状態にあるか, (3)また逆に細胞はどのように凝集体を識別しソーティングしているのか, に着目して調べて行きたい。さらに, アンチトリプシン欠損症で観察されたタンパク質の規則正しい凝集体形成の一般性についても調べて行く(図 2)。(文責: 山崎)

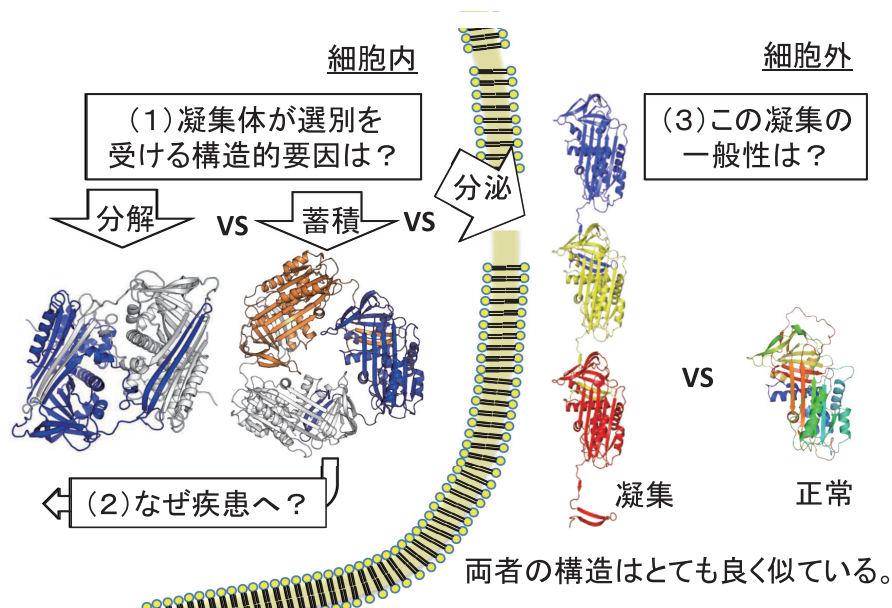


図 2 アンチトリプシンの多様な凝集体形成とその細胞内ソーティング  
 α<sub>1</sub>-Antitrypsin は互いの構造モチーフを交換して天然構造と非常に似通った規則正しい凝集体構造を形成することができる。その凝集体形成メカニズムは少なくとも 3 つあり, 交換する構造モチーフが異なる。それらは細胞内で異なるソーティングを受けているようであり, (a) 安定に蓄積し疾患を引き起こす病原性を持つもの (b) 分解されるもの (c) 分泌されるもの, があると予想される。

**Figure 2 Structurally distinct α<sub>1</sub>-antitrypsin polymers and their intracellular sorting**  
 α<sub>1</sub>-Antitrypsin forms very regular polymer conformation, which well resembles to the native, by swapping the structural motifs. Three mechanisms were so far identified and can be distinguished by finding the motifs where they swap. In cells, they are likely to be recognized and sorted as (a) a pathogenic polymer that stably accumulates and leads to the disease (b) a substrate for degradation (c) a substrate for secretion.

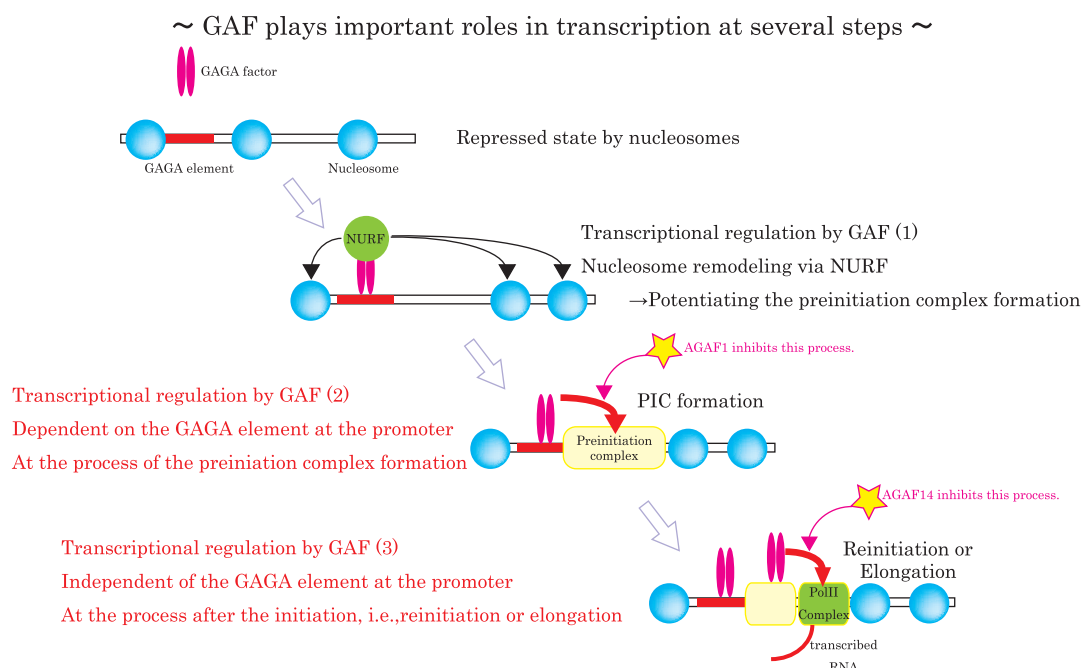
### 3. 基本転写機構の解析と RNA aptamer の応用に関する研究

従来から研究を進めている RNA アプタマーを用いた基本転写機構の解析に関する技術の一つとして, 異なる特

異性をもった複数アプタマーを、同一の RNA プールから選択できる選別方法を確立し、BBB に報告した。

同様の方法で取得したショウジョウバエのクロマチンリモデリングに関与する GAGA 因子に対するアプタマーを用いた解析によって、核抽出液時におけるバッファのわずかな塩濃度の変化が、転写複合体の組成を替える事を明らかにした。この結果は、転写調節機構として再注目されている paused polymerase の成立機構における基本転写因子群の機能の解明に新たな道筋をつけるものと考えている(図 3)。

今年度から、新たにコラーゲンペプチドに対する RNA アプタマーの取得を試みている。コラーゲン機能部位に対する有効な抗体は存在しない。これは、この部位が、有効な抗原性を提示できないことを意味している。このように有効な抗体が作成できない抗原性の弱い標的に対して、アプタマーの取得が可能か、また、そのアプタマーは実用に耐える特性を示すかを試す好例になることを期待して開始した。現時点では、有効な分子はとれていないものの、道筋として間違いがないことを示すデータが得られ、今後の展開に期待がもたれる。(文責：平芳)



GAF による転写調節 (1)

NURF を介したクロマチンのリモデリングが preinitiation complex の形成を可能にする。

GAF による転写調節 (2)

転写調節領域に存在する GAGA 配列に依存的な過程：preinitiation complex の形成。

AGAF1 アプタマーはこのステップを阻害する。

GAF による転写調節 (3)

GAGA 配列非依存的な過程：開始以降のステップで、伸長過程、re-initiation 過程

AGAF14 アプタマーはこのステップを阻害する。

**Figure3 GAF plays important roles in transcription at several steps**

Transcriptional regulation by GAF (1)

Nucleosome remodeling via NURF : Potentiating the preinitiation complex formation

Transcriptional regulation by GAF (2)

Dependent on the GAGA element at the promoter

The process of the preinitiation complex formation.

AGAF1 aptamer inhibits the formation of preinitiation complex.

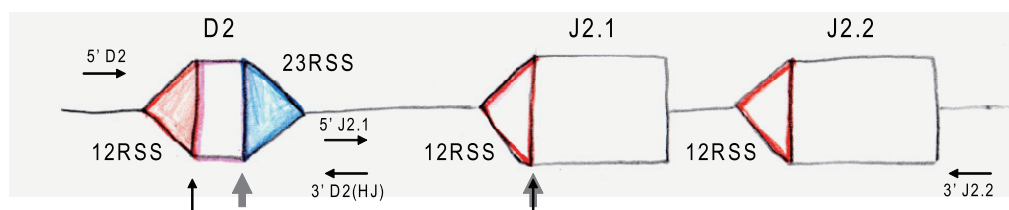
Transcriptional regulation by GAF (3)

Independent of the GAGA element at the promoter

The process after the initiation, i.e., reinitiation or elongation.

AGAF14 aptamer inhibits these step.





Sequencingの結果、HJではなくCJ?であった

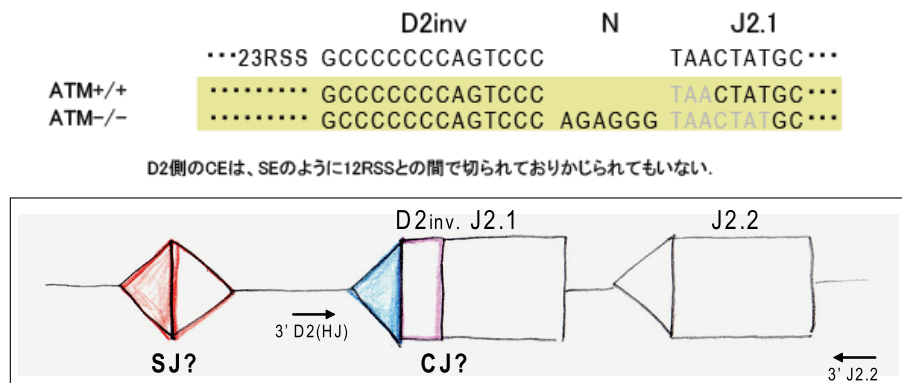


図4 D2-J2.1の異常な組換えで形成された構造

本来 3' D2 23RSS の所で RAG により切断されるべきなのに、5' D2 12RSS の所で切断されていた。その結果、D2 は逆向きに J2.1 とつながっていた。

Figure4 Aberrantly rearranged D2J2.1 construct

RAG did cut 5' 12RSS, although it normally cuts 3' 23RSS. As a result, inverted D2 was joined to J2.1.

#### 4. 正常マウス胸腺より検出される異常な TCRβ 鎖遺伝子 V(D)J 組換え構造の研究

前年度までに、TCRβ 鎖遺伝子 D2-J2.1 あるいは D2-J2.2 組換えの過程で低い頻度ながら生じたハイブリッド・ジョイントと考えられる構造を、PCR で正常マウス胸腺から検出していた。PCR 産物の塩基配列を決定したところ、D2-J2.1 の組換えではハイブリッド・ジョイントではなく、5' 12RSS と D2 の間で切断された D2 コーディングエンドが逆向きに J2.1 コーディングエンドと結合したコーディング・ジョイントであることが判明した(図4)。本来の組換えで J2.1 コーディングエンドと結合するのは、3' 23RSS と D2 の間で切断された D2 コーディングエンドであから、このような V(D)J 再構成は異常である。D2-J2.2 の組換えではハイブリッド・ジョイントが形成されていたものの、シグナルエンドの末端が保存されていない特殊な構造であった。

非相同的 DNA 末端結合機構で重要な役割を果たしている ATM(ataxia-telangiectasia mutated)タンパクを欠くと、リンパ腫の発生率が上昇することがよく知られている。また、ハイブリッド・ジョイントが形成されやすくなることも報告されている。しかしながら今回明らかにした構造の検出頻度は、ATM<sup>-/-</sup>マウス胸腺において上昇してはいなかった。D-J 再構成が開始される時期に、転写調節因子 USF-1 が 5' D2 12RSS に結合し D2 上流のプロモーターからの転写を抑制していることが、最近報告された。この USF-1 の結合が、立体構造上 RAG による D2-J2.1 および D2-J2.2 複合体形成に何らかの影響を及ぼし、異常な組換えの原因になったと考えられる。(文責：藤本)

Department of Molecular and Cellular Biology consists of the following four groups.

#### 1. Protein quality control mechanism ; how proteins are folded and degraded in the endoplasmic reticulum

One of the research interests in the Department of Molecular and Cellular Biology is the study on the regulation

and function of molecular chaperones/stress proteins and lectins, and on the mechanism of protein quality control.

Newly synthesized proteins obtain their native conformations by the assistance of molecular chaperones. However, the process of protein folding is error-prone, and polypeptides that failed to obtain native structures enter the refolding cycle or are subjected to intracellular protein degradation. Many secretory proteins and membrane proteins are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER), and their folding is regulated by the ER quality control mechanism (ERQC). Terminally misfolded polypeptides in the ER are degraded by the cytoplasmic proteasomes after retrotranslocation through the ER membrane, a mechanism known as ER-associated degradation (ERAD). Many works have clarified the importance of ERAD of misfolded proteins and the disruption of ERQC in genetic diseases, neurodegenerative disorders, and diabetes mellitus. Since most of the proteins synthesized in the ER are *N*-glycosylated, ERQC of glycoproteins are regulated by the processing of *N*-glycans and the recognition of specific sugar moieties by the lectins.

At the ER membrane, membrane-embedded ubiquitin ligases ubiquitinate proteins that are extracted from the ER. HRD1, a multi-pass transmembrane ubiquitin ligase stoichiometrically associates with SEL1L, a single-pass membrane protein, and further forms a large complex by the association of various components to regulate the ERAD (Figure 1). SEL1L protein has a large domain in the ER lumen, and associates with chaperone proteins and lectins. In mammalian cells, SEL1L protein is unstable and is rapidly degraded, which is stabilized by the association with HRD1. We have recently identified the SEL1L domain that is responsible for its instability and degradation of ERAD substrates. Also, we are studying on proteins that are upregulated by ER stress, and now focusing on proteins that have characteristics of possible new chaperones. (by N. Hosokawa)

## 2. Chasing the pathogenic protein aggregation : their formation and structural equilibrium

One of the most important targets in frontier regeneration therapy will be Parkinson's disease, which is largely induced by the protein aggregations and their accumulation. Alzheimer's disease and Huntington's disease are other famous examples. Protein aggregation occurs when proteins are unable to fold properly e.g. due to the familial mutations, and their accumulation occurs when they are not properly degraded.

We have focused on the underlying molecular mechanism for the  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency. It is very popular disease in North Europe and America because not a small number of Caucasians have Z-allele genetic defect (4% for heterozygote and 0.1% for homozygote), while we Mongoloid have almost none of pathogenic mutations.  $\alpha_1$ -Antitrypsin deficiency is typically characterized by the intracellular deposition of the  $\alpha_1$ -antitrypsin aggregates and inclusion bodies in patient hepatocyte. This seems to be the direct cause for juvenile cirrhosis, and alternatively emphysema due to the lack of secreted  $\alpha_1$ -antitrypsin in plasma that inhibits neutrophil elastase. We first examined how  $\alpha_1$ -antitrypsin can polymerize *in vitro* on the basis of X-ray crystallographic techniques. Interestingly,  $\alpha_1$ -antitrypsin can polymerize via at least 3 distinct mechanisms by swapping their structural motifs in different ways. Each polymer structure seems very similar to the native  $\alpha_1$ -antitrypsin structure. The lack of structural abnormality might tell why antitrypsin aggregates are able to escape from degradation and stably accumulate in cells. Importantly, only one of the polymer forms well accumulated in the liver inclusions obtained from the Z- $\alpha_1$ -antitrypsin patient, which was confirmed by a monoclonal antibody sensitive to the polymer forms. Further cellular studies indicated the other polymer forms seemed to be degraded or secreted. These collectively suggested many  $\alpha_1$ -anti

trypsin polymer forms may exist in equilibrium but not all are pathogenic. Moreover, it has been recently revealed that each polymer form can modulate their structure, indicating protein toxicity might also modulate. Now, questions on the  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency are as follows (1) how these dynamic polymer formation affects the intracellular homeostasis (2) where is the most toxic fraction of polymers (3) how cellular systems watch and sort these structurally distinct polymer forms. (by M. Yamasaki)

### 3. Study on the basal transcription factors and the application of RNA aptamers

We showed a novel selection procedure for RNA aptamers against a protein that constitutes a single structural domain, and published the paper entitled "Perturbation of discrete sites on a single protein domain with RNA aptamers; Targeting of different sides of the TATA-binding protein (TBP)". We obtained two kinds of aptamer which bind to GAF with a high affinity using a same procedure. Using these aptamers a little change of buffer condition of the nuclear preparation leads the difference of transcription complex. This result leads to clarify the role of basic transcription factors in the paused polymerase establishment, which is refocused as an important step of transcription control.

To figure out the effectiveness of RNA aptamer against proteins with weak antigenicity, we started the selection of RNA aptamers against collagen peptides. There is no antibody against to functional domains of collagen that means there domains have weak antigenicity. If we get RNA aptamers against these regions, it could be a direct evidence of the availability for the molecule with low antigenicity. We have not gotten satisfied aptamer, but a couple of data suggest our strategy is right way to get molecules. (by K. Hirayoshi)

### 4. Aberrant TCR $\beta$ gene V (D) J recombinational products from normal murine thymus.

We had detected very rarely recombined "hybrid joints" between *Tcrb* D2 and J2.1 or J2.2 by PCR. Sequencing has revealed that the "hybrid joint" between D2 and J2.1 is actually an aberrant coding joint between inverted 5' D2 coding end and J2.1 coding end (Figure 4). For normal D2-J2 rearrangement, the 3' D2 side is cut. Also sequencing has confirmed the hybrid joint between D2 signal end and J2.2 coding end. Unexpectedly, however, the signal end is not intact.

Lack of ATM (ataxia-telangiectasia mutated), which plays an important role in non-homologous DNA end joining pathway, often predisposes mice to lymphomas and contributes to generate hybrid joints. Nevertheless, we could not detect these aberrant constructs more frequently in ATM<sup>-/-</sup> thymus. It has been reported that a transcription factor USF-1 binds with the 5' D2 12RSS and suppresses the transcription from the D2 upstream promoter when D-J rearrangement occurs. Therefore, it is likely that the USF-1 binding sterically affects D2-J2.1 and D2-J2.2 complex formation by RAG leading to aberrant joining. (by S. Fujimoto)



## 【業績目録】

## ◆ 誌上発表 ◆

## 1) 原著論文

- Fujimori T, Kamiya Y, Nagata K, Kato K, Hosokawa N.: Endoplasmic reticulum lectin XTP3-B inhibits endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded  $\alpha 1$ -antitrypsin variant. *FEBS J.* : **280**, 1563-1575 (2013)
- Ken I Hohmura, K., Shi, H., Kazunori Hirayoshi, K.: Perturbation of discrete sites on a single protein domain with RNA aptamers: Targeting of different sides of the TATA-binding protein (TBP). *BioSci. Biotechnol. Biochem.* **77**: 1739-1746 (2013)
- Hirano, S., Kakinuma, S., Amasaki, Y., Nishimura, M., Imaoka, T., Fujimoto, S., Hino, O., Shimada, T.: *Ikaros* is a critical target during simultaneous exposure to X-rays and N-ethyl-N-nitrosourea in mouse T-cell lymphomagenesis. *Int. J. Cancer*, **132**, 259-268 (2013)

## 2) 著書および総説

- 山崎正幸：セルピン凝集性疾患：その重合メカニズムを中心に。日本血栓止血学会誌。 **24**:530-533(2013)なし

## ◆ 学会等の発表 ◆

## 1) 学会・研究会発表

- 細川暢子：小胞体からのタンパク質逆行輸送メカニズム。平成25年度京都大学再生医科学研究所学術講演会(2013.12.25. 京都市)(ポスター発表)
- Masayuki Yamasaki: Probing the equilibrium of Serpin conformations. 4<sup>th</sup> International Symposium on Diffraction Structural Biology ISDSB2013(2013.5.26-29. Nagoya)
- 山崎正幸：タンパク質の組体操：セルピンの折りたたみの不思議とは？ 第13回日本蛋白質科学会年会(2013.6.12-14. 鳥取)
- 山崎正幸：なぜ鶏卵オボアルブミンは保存により熱安定化できるか？ 第4回生命機能研究会(2013.9.21-22)
- 法邑賢一・平芳一法：転写複合体に含まれるショウジョウバエ GAF の RNA アプタマーによる機能解析, (2013.12.3-6. 神戸)
- FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko, HIRANO Shinobu, SHIMADA Yoshiya: Analysis of *Tcrb* gene rearrangement in spleen tumors from Mlh1-deficient mice. The 6<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013(2013.6.3-7. 京都)
- KAKINUMA Shizuko, HIRANO Shinobu, FUJIMOTO Shinji, TAKIMOTO Misaki, AMASAKI Yoshiko, NISHIMURA Mayumi, SHIMADA Yoshiya: Splenic lymphomas of *Mlh1*-deficient mice induced by in utero irradiation are derived from invariant natural killer T cell. The 6<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference 2013(2013.6.3-7. 京都)
- 藤本真慈, 高木正稔, 平野しのぶ, 柿沼志津子, 島田義也, 水谷修紀: ATM 欠損と関係していない異常な *Tcrb* D2-J2.1 再構成。第36回日本分子生物学会年会(2013.12.3-6. 神戸)
- FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko: Invariant natural killer T cell lymphomas in Mlh1-deficient mice. 第42

回日本免疫学会学術集会(2013.12.11-13. 千葉)

藤本真慈：マウス T 細胞レセプター  $\beta$  鎖遺伝子 D2-J2 領域は本当に再構成しにくいのか？ 平成 25 年京都大学再生医科学研究所学術講演会(2013.12.25. 京都)

## 2) 招待講演・シンポジウムなど

細川暢子：小胞体膜におけるプロテオスタシス維持機構. 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「ER・Post-ER における膜プロテオスタシスネットワーク研究の新展開」(口頭発表)(2013.12.5. 神戸市)

Masayuki Yamasaki: Structural Diversity in Serpins on their function and disfunction. Koc University – Kyoto University International Symposium on “New Frontier in Health Sciences & Technologies”(2012.9.17-18. Kyoto)

## 生体機能調節学分野 Department of Experimental Pathology

客員教授 坂口 志文

Visiting Prof. Shimon Sakaguchi

### 【研究概要】

#### (1) 免疫寛容の基礎的研究

正常な免疫系は、非自己抗原に対して免疫応答を示すが、正常自己構成成分に対しては反応しない。また、アレルギーに見られる過剰な免疫応答を阻止する機構を有している。このような免疫自己寛容、免疫恒常性維持の基礎的メカニズムとして、制御性 T 細胞 (Regulatory T cells, Treg と略) による抑制的制御が重要である。その機能異常は自己免疫病、アレルギーの原因となる。また Treg を標的として、その数的減少、抑制能減弱により癌免疫、感染免疫の惹起・亢進を図り、その数的増大、抑制能強化により移植臓器に対する免疫寛容の誘導が可能である。

昨年度、Treg は転写因子 Foxp3 を特異的に発現するが、機能、表現型の安定性を保つためには epigenetic な変化が必要であることを示した。本年度、ゲノム全体での CpG 脱メチル化部位を MedIP 法で検索し、Treg 特異的脱メチル化部位を同定したところ、すべてのメチル化部位のうち約 0.2% が Treg 特異的脱メチル化を有していた。続けて、代表的な Treg 特異的脱メチル化部位を Bisulphite 法で詳細に解析、確認し、それらが Treg 特異的エピゲノムマーカーとして重要、有用であることを示した。さらに、Foxp3 結合部位と Treg 特異的脱メチル化部位の関係、また遺伝子発現におけるそれぞれの役割を解析した。その結果、Treg 特異的脱メチル化部位は、主としてエンハンサーとして働き、一方、foxp3 はリプレッサーとして働いていることが明らかとなった。これらの知見は、機能的に安定な Treg の作製によるヒト免疫応答の制御に重要である。

#### (2) 自己免疫、腫瘍免疫、移植免疫の基礎的研究

当研究室では、ヒトの FoxP3<sup>+</sup>Treg を機能的に 3 サブセットに分けうることを示し、特定のサブセットを標的とすることで、ヒトの病的、生理的免疫応答の制御を目指している。その結果、最終的に分化し、最も抑制活性の高い制御性 T 細胞サブセット (effector Treg, eTreg と略) の量的減少を図るだけで、十分に免疫活性を促進・強化できる可能性を示した。さらに、この知見を腫瘍免疫の惹起・強化に応用すべく、eTreg に選択的なマーカー分子を検索したところ、有力な候補としてケモカインレセプター CCR4 が、eTreg に高発現しており、健康人末梢血から試験管内で CCR4<sup>+</sup>T 細胞を除去すれば、大部分の eTreg を除去できる可能性を見出した。実際、健康人末梢血 T 細胞を用いて、試験管内で CCR4<sup>+</sup>T 細胞を除去した T 細胞群を腫瘍抗原ペプチドで刺激したところ、腫瘍抗原特異的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 細胞を誘導できた。同様の操作により、腫瘍抗原特異的 T 細胞はメラノーマ患者末梢リンパ球からも誘導可能であった。ヒト CCR4 抗体は、本邦に多い成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (adult T cell leukemia/lymphoma, ATLL) の治療薬として認可されている。ATLL 細胞は、Foxp3 を発現しており、Treg の腫瘍化したものと考えられている。実際、抗 CCR4 抗体を投与された患者末梢血中では、腫瘍細胞のみならず、eTreg が選択的に著明に減少しており、そのような患者由来 CCR4<sup>+</sup> T 細胞を試験管内で自己白血病細胞によって刺激すると腫瘍抗原特異的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性化とサイトカイン産生が見られた。この結果は、ほかの癌、特に固形癌について、抗 CCR4 抗体投与による eTreg 除去と癌ワクチンによる免疫療法が有効である可能性を意味する。



その臨床試験を本年開始する予定である。

### (3) 新しい動物モデルを用いた関節リウマチの原因・発症機構の研究

当研究室で確立した SKG マウスは、免疫病理学的にヒトの関節リウマチと酷似する慢性関節炎を自然発症する。その原因遺伝子は、T 細胞抗原レセプター (T cell receptor, TCR) 直下に位置するシグナル分子である ZAP-70 であり、その SH2 ドメインの一塩基変異によって関節炎が誘導される。昨年度より、この遺伝子変異の自己免疫病発症における意味を普遍化すべく、ZAP-70 分子の様々な部位にアミノ酸変異をもち、その SH2 ドメインと TCR 鎖 ITAM 部位との結合度の異なるノックインマウスを作製し、解析している。本年度、変異を入れた ZAP-70 蛋白の構造変化と TCR 鎖との結合度との関係、およびシグナル伝達の変化について解析した。その結果、シグナル強度と、胸腺における正負の選択、Treg の産生の関係について、TCR シグナル減弱による TCR レパトアの自己反応性への偏移、同時に Treg の産生低下により特定の自己免疫病を誘導できるとの結果を得た。

This department studies: (i) the cellular and molecular basis of immunologic self-tolerance and the etio-pathology of autoimmune disease; (ii) the strategy for eliciting effective immune responses to autologous tumor cells, or inducing immunologic tolerance to organ transplants, by manipulating the mechanism of immunologic self-tolerance; and (iii) the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis by utilizing an animal model established in our laboratory.

One aspect of immunologic self-tolerance (*i.e.*, immunological unresponsiveness of the normal immune system to normal self-constituents) is actively maintained through a T cell-mediated dominant control of self-reactive T cells by naturally occurring regulatory CD4<sup>+</sup> T cells (Tregs). We previously showed that the transcription factor Foxp3 is a master regulator of their development and function. In the previous year, we showed that Treg development was achieved by the combination of two independent processes, *i.e.*, the expression of Foxp3 and the establishment of Treg-type CpG hypomethylation, both induced by TCR stimulation. This year we have analyzed genome-wide methylation status of Treg cells compared with conventional T cells. By MeDIP sequencing and more precisely by Bisulfite sequencing, we found that limited regions of the genome (~0.2%) were differentially methylated between the two populations; these regions were mainly present in gene bodies and non-CpG islands, and specifically demethylated in Tregs. Transcription start site analysis by CAGE method has revealed that these Treg-specific demethylated regions mainly act as enhancers of gene regulation while Foxp3-binding site as gene repressors upon TCR stimulation. These results indicate that Treg-specific epigenome changes and Foxp3 expression play distinct roles in Treg development and function. These findings are instrumental for constructing functionally stable Treg cells for clinical use.

This laboratory has been studying Treg cells in humans. We have shown that human FOXP3<sup>+</sup> T cells can be dissected into three subpopulations including suppressive and non-suppressive ones. The most differentiated and suppressive population is FOXP3-high CD25-high CD45RA-low cells, called effector Treg (eTreg) cells. To enhance immune responses by specifically depleting eTreg cells, we have been looking for a cell surface molecule that is selectively expressed by eTreg cells. One of the candidates has turned out to be the chemokine receptor CCR4. Indeed in vitro depletion of CCR4<sup>+</sup> cells from peripheral blood T cells selectively reduced eTreg cells and evoked immune responses against tumor-associated antigens in healthy individuals and also in cancer patients. In

vivo administration of anti-CCR4 monoclonal antibody, which is now in use to kill CCR4<sup>+</sup> leukemic cells in adult T-cell leukemia/lymphoma patients in Japan, also eliminated eTreg cells and evoked immune responses against leukemic cells by CD4 and CD8 T cells in patients. Based on these findings we plan to embark a new immunotherapy of cancer this year by depleting eTreg cells and subsequently immunizing with cancer vaccine.

This laboratory previously established an animal mode of autoimmune arthritis, called SKG mice, which possess a ZAP-70 gene mutation and spontaneously develop T cell-mediated autoimmune arthritis immunopathologically similar to rheumatoid arthritis (RA) in humans. This year, we have established another animal model of autoimmune disease by introducing a variety of mutations in the ZAP-70 gene in mice. One of such ZAP-70 gene knock-in mice spontaneously developed not only arthritis but also colitis, which are immunopathologically similar to RA and inflammatory bowel disease in humans. We have investigated how the mutation affects the structure of ZAP-70 and the binding of ZAP-70 to TCR $\zeta$  chains, and downstream signal transduction. These spontaneous models of autoimmune disease due to TCR signal alteration are instrumental in understanding the pathogenetic mechanisms of autoimmune diseases in humans and devising new ways of their prevention and treatment,

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Morikawa H, Ohkura N, Vandenbon A, Itoh M, Nago-Sato S, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest A, Standley D, Date D, Sakaguchi S, and the FANTOM consortium. Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *PNAS*. In press.
- Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function : From a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol. Rev.* In press.
- Forrest A, Kawaji H, Michael Rehli, et al., A promoter level mammalian expression atlas. *Nature*. In press.
- Wing JB, Sakaguchi S. Foxp3<sup>+</sup> Treg cells in humoral immunity. *Int Immunol.* 2013. In press.
- Fujii H, Arakawa A, Utsumi D, Sumiyoshi S, Yamamoto Y, Kitoh A, Ono M, Matsumura Y, Kato M, Konishi K, Shiga T, Sano S, Sakaguchi S, Miyagawa-Hayashino A, Takahashi K, Uezato H, Miyachi Y, Tanioka M. CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes at primary sites as a possible prognostic factor of cutaneous angiosarcoma. *Int J Cancer*. 2013. In press.
- Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* In press.
- Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jäger E, and Sakaguchi S. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells, evoking anti-tumor immune responses in humans. *PNAS*. 110 : 17945-17950, 2013.
- Iyer SS, Latner DR, Zilliox MJ, McCausland M, Akondy RS, Macmaster-Penaloza P, Hale JS, Ye L, Mohammed AU, Yamaguchi T, Sakaguchi S, Amara RR, Ahmed R. Identification of novel markers for mouse CD4<sup>+</sup> T follicular helper cells. *Eur J Immunol.* 2013 Sep 12. doi : 10.1002/eji.201343469.
- Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M,

- Honda K. T<sub>reg</sub> induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 500 : 232-236, 2013.
- Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity*. 38 : 414-423, 2013.
- Htun Oo Y, and Sakaguchi S. Regulatory T cell directed therapy in liver diseases. *J. Hepatol*. 59 : 1127-34, 2013.
- Yamaguchi T, Kishi A, Osaki M, Morikawa H, Prieto-Martin P, Wing K, Saito T, and Sakaguchi S. Construction of self-recognizing regulatory T cells from conventional T cells by controlling CTLA-4 and IL-2 expression. *PNAS*, 110(23) : E2116-2125, 2013.
- Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S. Molecular determinants of regulatory T cell development : the essential roles of epigenetic changes. *Front Immunol*. 2013 May 10 ; 4 : 106. doi : 10.3389/fimmu.2013.00106.
- Sakaguchi S, Vignali DAA, Niec, RE, Rudensky AY, and Waldmann H. Regulatory T cell plasticity and stability. *Nat. Rev. Immunol*. 13(6) : 461-467.
- Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DA, Ziegler SF. Regulatory T cells : recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. 14 : 307-308, 2013.
- Keith RC, Sokolove J, Edelman BL, Lahey L, Redente EF, Holers VM, Sakaguchi S, Robinson WH, Riches DW. Testosterone is protective in the sexually dimorphic development of arthritis and lung disease in SKG mice. *Arthritis Rheum*. 65 : 1487-1493, 2013.
- Hirayama M, Nishikawa H, Nagata Y, Tsuji T, Kato T, Kageyama S, Ueda S, Sugiyama D, Hori S, Sakaguchi S, Ritter G, Old LJ, Gnajatic S, Shiku H. Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of *Streptococcus pyogenes*. *Eur J Immunol*. 43 : 989-1000, 2013.

## 2) 総 説

- 西川博嘉, 坂口志文 : 制御性 T 細胞の臨床応用への展望 炎症と免疫 Vol.21 No.1(66-72)2013
- 坂口志文 : 免疫応答の負の制御 : 免疫恒常性の維持と疾患治療への応用 細胞工学 Vol.32 No.12(1202-1204) 2013
- 大倉永也 : 制御性 T 細胞操作による疾患治療の展望 細胞工学 Vol.32 No.12(1245-1250)2013
- 田中 淳, 坂口志文 : ZAP70 の変異と自己免疫疾患 臨床免疫・アレルギー科 Vol.60 No.6(693-697)2013

---

## ◆ 学会等の講演 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- M. Hamaguchi, K. Sakai, N. Ohkura, H. Morikawa, Y Shimazu, H.J. Fehling, T. Sparwasser, T. Hirose, S. Sakaguchi : Constitution of the Foxp3 complexe : key association of Bcl11b to CTLA-4 dependent Treg suppressive function. The 2<sup>nd</sup> NIF Winter School 2013 on Advanced Immunology (2013.1.20-25. Singapore)
- H. Morikawa, N. Ohkura, A. Vandenbon, D.M. Standley, S. Sakaguchi : The Effect of Regulatory T cell-specific Epigenetic Conversion on its Transcriptional Regulation. The 2<sup>nd</sup> NIF Winter School 2013 on Advanced Immunology (2013.1.20-25. Singapore)



- Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S: Regulatory T-cells modulate T-follicular helper and germinal center formation via CTLA-4. The 6<sup>th</sup> International Workshop of Kyoto T Cell Conference (2013.6.3-7. 京都)
- Atsushi Tanaka, S. Maeda, T. Nomura, S. Tanaka, L. Jin, S. Akitzuki, N. Sakaguchi, R. Zamoyska, D.M. Standley, S. Sakaguchi: Breakdown of immune tolerance by quantitative and qualitative alterations of ZAP-70. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2013.8.22-27. Milan, Italy)
- Masahide Hamaguchi, K. Sakai, N. Ohkura, H. Morikawa, Y. Shimazu, J. B. Wing, S. Sakaguchi: Essential role for Bcl11b in the FoxP3 transcriptional complex and T regulatory cells suppressive function. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2013.8.22-27. Milan, Italy)
- Akihiko Kitoh, N. Kusuba, Y. Miyachi, S. Sakaguchi, Y. Yanagi, K. Kabashima: SLAM-dependent and independent mechanism of IgE induction. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2013.8.22-27. Milan, Italy)
- Tanaka Atsushi, Maeda Shinji, Nomura Takashi, Akitzuki Shuji, Standley Daron, Sakaguchi Noriko, Sakaguchi Shimon: Breakdown of immune tolerance by quantitative and qualitative alterations of TCR signaling through ZAP-70. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013 (2013.12.11-13. 幕張)
- Sugiyama Daisuke, Nishikawa Hiroyoshi, Maeda Yuka, Nishioka Megumi, Teramura Atsushi, Katayama Ichirou, Ezoe Sachiko, Kanakura Yuzuru, Sato Eiichi, Fukumori Yasuo, Julia Karbach, Elke Jager, Sakaguchi Shimon: Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and augments anti-tumor immune responses in humans. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013 (2013.12.11-13. 幕張)
- Ito Yoshinaga, Hashimoto Motomu, Nomura Takashi, Sakaguchi Noriko, Sakaguchi Shimon: An arthritogenic TCR obtained from CD4<sup>+</sup> T cell in spontaneous autoimmune arthritis. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013 (2013.12.11-13. 幕張)
- Dennis Adeegbe, Daisuke Sugiyama, Hiroyoshi Nishikawa, Shimon Sakaguchi: Accumulation of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells is positively correlated with appearance of exhaustion-like phenotype in tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013 (2013.12.11-13. 幕張)
- Kitagawa Yoko, Ohkura Naganari, Hirota Keiji, Taniuchi Ichiro, Kohwi-Shigematsu Terumi, Sakaguchi Shimon: Control of Foxp3 expression by a genome organizer Satb1. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013 (2013.12.11-13. 幕張)
- Yamaguchi Tomoyuki, Machiyama Hiroaki, Sakaguchi Shimon, Fujita Hideaki: Modeling for T cell-mediated immune regulation: Single Molecule Imaging Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013 (2013.12.11-13. 幕張)
- Wing James Badger, Ise Wataru, Kurosaki Tomohiro, Sakaguchi Shimon: Regulatory T cells modulate T follicular helper and germinal center formation via CTLA-4. Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013 (2013.12.11-13. 幕張)
- Mikami Norihisa, Ohkura Naganari, Shimon Sakaguchi: Roles of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in suppressive function of regulatory T cells Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013 (2013.12.11-13. 幕張)

## 2) 講演・シンポジウム

Shimon Sakaguchi: The Molecular Basis of Treg-Mediated Suppression. The 2<sup>nd</sup> NIF Winter School 2013 on Advanced Immunology (2013.1.20-25. Singapore)

Shimon Sakaguchi: Genetic and epigenetic control of regulatory T cell development. JST-CREST International Symposium Frontiers in Immunology and Inflammation from Molecules to Disease (2013.2.12-13. 東京)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. Tri-Institutional Immunology and Microbial Pathogenesis Program Research Seminar Series (2013.3.4. New York USA)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. Immunology seminar Series Harvard Medical School (2013.3.6. Boston USA)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. Immunology seminar Series Massachusetts General Hospital (2013.3.7. Boston USA)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells for immune tolerance and homeostasis. Karolinska Research Lectures at Nobel Forum (2013.4.4. Stockholm Sweden)

Shimon Sakaguchi: Genetic and epigenetic control of regulatory T cell development. The Eberly Distinguished Lectureship in Immunology (2013.4.25. Pittsburgh USA)

Shimon Sakaguchi: Epigenetics and plasticity of regulatory T cells. The American Association of Immunologists Annual Meeting (2013.5.3-7. Hawaii USA)

坂口志文: 制御性 T 細胞と自己免疫, がん免疫の基礎 第 1 回免疫フロンティア B to B セミナー (2013.5.24. 大阪)

Shimon Sakaguchi: Altered T cell signal transduction and autoimmunity. 40th IMSUT (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo) Founding Commemorative Symposium (2013.5.31. 東京)

Shimon Sakaguchi: Genetic and epigenetic control of regulatory T cell development. The 6<sup>th</sup> International workshop of Kyoto T Cell Conference (2013.6.3-7. 京都)

Shimon Sakaguchi: Genetic and epigenetic control of regulatory T cell development. Immunology Interest Group Seminar Series in NIH (2013.6.12. Bethesda USA)

Shimon Sakaguchi: Genetic and epigenetic control of regulatory T cell development. Program in Immunology Seminar Series University of Alabama at Birmingham (2013.6.13. Alabama USA)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 34 回日本炎症・再生医学会 (2013.7.2-3. 京都)

Shimon Sakaguchi: Plenary lecture: Control of immune responses by regulatory T cells. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2013.8.22-27. Milan, Italy)

Shimon Sakaguchi: Treg cell-mediated control of adaptive immune responses. 4<sup>th</sup> International GK Symposium Regulators of Adaptive Immunity (2013.9.27-29. Erlangen, Germany)

Shimon Sakaguchi: Keynote lecture Control of immune responses by regulatory T cells. 4<sup>th</sup> International Workshop on Humanized Mice (2013.9.30-10.2. Seoul, Korea)

Shimon Sakaguchi: Keynote lecture Regulatory T cells, Immune Tolerance and Treg Plasticity. URI/EpiVax Westin Immunogenicity Seminar (2013.10.8. Osaka)

坂口志文: 免疫細胞遺伝子 Treg と血液疾患癌微小環境における免疫抑制機構とその打破による新たな癌免疫治療 第 75 回日本血液学会学術集会 (2013.10.11-13. 札幌)

坂口志文: 腫瘍免疫と制御性 T 細胞 臨床血液セミナー (2013.11.1. 大阪)

坂口志文：腫瘍免疫と制御性 T 細胞 KYOTO MYELOMA FORUM (2013.11.9. 京都)

Shimon Sakaguchi：Keynote lecture：Regulatory T cells. 12<sup>th</sup> International Xenotransplantation Association Congress 2013 (2013.11.10-13. Osaka)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (2013.11.28-30. 東京)

坂口志文：制御性 T 細胞：Update 第 41 回日本臨床免疫学会総会 (2013.11.27-29. 下関)

Shimon Sakaguchi：Genetic and epigenetic basis of regulatory T cell development and function. German-Japan Immunology Seminar 2013 in Shizuoka “Challenge in Immunology for Opening the Door to the Understanding of Human System and Disease” (2013.12. 5-9. 静岡)

Shimon Sakaguchi：Distinct roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell development and function. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013 (2013.12.11-13. 幕張)

坂口志文：今日のヒューマン免疫ロジーの進歩 ヒューマン免疫ロジー フォーラム 日本のヒューマン免疫ロジーの明日に向かって (2013.12.14. 東京)



## 生体システム制御学分野 Department of Immunobiology and Hematology

分野主任 教授 長澤 丘司

Prof. Takashi Nagasawa

### 【研究概要】

リンパ球を含むすべての血液細胞やその前駆細胞は、骨の中心部の骨皮質に囲まれた空間である骨髄で造血幹細胞から一生涯にわたり恒常的に産生される。造血幹細胞や前駆細胞は、骨髄の中に想定されているニッチ(niche)と呼ばれる特別な微小環境で維持され、その増殖・分化が調節されていると推測されてきたがこの造血ニッチの実体は長年不明であった。2003年、米国のLiらは、骨辺縁の骨芽細胞の一種でありNカドヘリンを高発現するSNO細胞が造血幹細胞ニッチを形成することを報告し注目された(Zhang, J. et al., *Nature* 425, 836-841(2003))。一方、米国のMorrisonらは、造血幹細胞の多くは骨髄腔内で網の目のように分布する洞様毛細血管の周囲に存在することを報告した(Kiel, MJ. et al., *Cell* 121, 1109-1121(2005))。しかし、Liらの報告の根拠となった造血幹細胞の組織学的観察法は十分とは言えず(Kiel, MJ. et al., *Nature* 449; 238-242(2007))、Nカドヘリン欠損マウスの造血幹細胞数は正常であり、骨芽細胞の造血幹細胞ニッチとしての機能が証明されるには至っていない。

私たちは、これまでに、遺伝子欠損マウスを用いた解析によりケモカインCXCL12とその生理的受容体CXCR4が、胎生期における造血幹細胞の骨髄へのホーミング(細胞が臓器に移動、定着すること)、成体骨髄での造血幹細胞と形質細胞(最終分化し抗体産生に特化したB細胞)の維持やB細胞(抗体を産生する主要な免疫担当細胞)と形質細胞様樹状細胞(pDC)(I型インターフェロンを多量に産生する抗ウイルス免疫に重要な免疫担当細胞)の産生に必須であることを明らかにした(Nagasawa, T. et al., *Nature* 382, 635-638(1996); Tachibana, K. et al., *Nature* 393, 591-594(1998); Egawa, T. et al., *Immunity* 15, 323-334(2001); Ara, T. et al., *Immunity* 19, 257-267(2003); Sugiyama, T. et al., *Immunity* 25, 977-988(2006); Kohara, H. et al., *Blood* 110, 4153-4160(2007))。さらに、CXCL12の生理的な発現細胞を可視化することができるCXCL12遺伝子座にGFP遺伝子を挿入したマウス(CXCL12-GFPノックインマウス)を用いて、成体骨髄において骨髄腔内にびまん性に分布しCXCL12を高発現する細網細胞(以下CXCL12-abundant reticular(CAR)細胞)が存在することを見出した。また、洞様毛細血管の大部分はCAR細胞に取り囲まれており、造血幹細胞を濃縮する分画内の細胞、早期のB細胞の前駆細胞や形質細胞、pDCの大部分がCAR細胞の長い細胞突起に接着していた(Tokoyoda, K. et al., *Immunity* 20, 707-718(2004); Sugiyama, T. et al., *Immunity* 25, 977-988(2006); Kohara, H. et al., *Blood* 110, 4153-4160(2007))。

＊

次に、私たちは、CAR細胞の生体でのニッチとしての機能を証明するため、ヒト特異的なジフテリア毒素(DT)受容体遺伝子を用いてDTによりCAR細胞の特異的細胞死を誘導することができるマウス(以後CAR細胞欠損マウス)を作製し解析した。その結果、CAR細胞は、造血幹細胞の増殖と未分化性の維持に必須であること、B細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞の増殖にも必須であること、造血に必須のサイトカインであるCXCL12、SCFの骨髄での主たる産生細胞であることを明らかにした。また、CAR細胞欠損マウスの骨髄細胞は、試験管内培養系で産生される骨芽細胞、脂肪細胞の細胞数が著明に減少しており、個々のCAR細胞の大部分が骨芽細胞、脂肪細胞の発生に必須の転写因子の遺伝子を両方発現し、試験管内培養で骨芽細胞または脂肪細胞に分化したことから、CAR

細胞は骨芽細胞・脂肪細胞共通前駆細胞であることが示された(Omatsu, Y. et al., *Immunity* 33, 387-399(2010)).

\*

2012年, 米国のMorrisonらによるSCFを発現する細胞を蛍光蛋白質GFPで可視化できるSCF-GFPノックインマウス(SCF遺伝子座にGFP遺伝子を挿入)の解析で, 骨髄にはSCFを高発現する細胞が存在してCD150<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>造血幹細胞分画の約67%と接着すること, SCF高発現細胞はレプチン受容体(leptin receptor; lepr)を特異的に高発現することが報告された。更に, レプチン受容体CreトランスジェニックマウスとCreによってSCF遺伝子が欠損するSCF<sup>flox/flox</sup>マウスの解析よりSCF高発現細胞でSCFを欠損させると造血幹細胞数が約5分の1に減少したことからSCF高発現細胞が造血幹細胞ニッチであることが報告された(Ding, L. et al., *Nature* 481; 457-462(2012))。先に述べたようにCAR細胞は, SCFの主たる産生細胞であることからSCF高発現細胞はCAR細胞とほぼ同一であると考えられる。実際, 私たちは, leprは骨髄においてCAR細胞で特異的に発現することを確認した。昨年, 米国ワシントン大学(セントルイス)のLinkらは, 私たちとの共同研究で, 骨髄の血管内皮細胞を除く非血球細胞でCXCL12を欠損するマウスでは造血幹細胞数が著減することを示した(Greenbaum, A. et al., *Nature* 495; 227-230(2013))。以上より, CAR細胞は, CXCL12とSCFを産生する造血幹細胞の増殖と未分化性の維持に必須のニッチ細胞であると考えられる(細網細胞ニッチ)。現在, ニッチによる正常と疾患における造血制御の全貌を明らかにすることを目標に, CAR細胞の形成と維持の分子機構(Omatsu, Y. et al., *Nature* in press), CAR細胞の造血幹細胞やリンパ球前駆細胞を維持する機構, CAR細胞の標的細胞の特異性を決定する機構, 炎症や感染症での造血調節におけるCAR細胞の機能とこれを制御する分子機構, CAR細胞の白血病幹細胞ニッチとしての機能を解明するための研究に取り組んでいる。

Chemokines are a large family of small structurally related chemoattractive cytokines that utilize seven-transmembrane spanning G-protein-coupled receptors (GPCR). We identified CXC chemokine ligand 12 (CXCL12), also known as stromal cell-derived factor (SDF)-1 as pre-B-cell growth stimulating factor and found that CXCL12 and its primary receptor CXCR4 were essential for hematopoiesis, including colonization of bone marrow by hematopoietic stem cells (HSCs) during ontogeny, maintaining a pool of HSCs in adult bone marrow and development of all immune cells produced in bone marrow, including B cells, plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and NK cells as well as cardiogenesis and organ vascularization during ontogeny (Nagasawa, T. et al., *Nature* 382, 635-638 (1996); Tachibana, K. et al., *Nature* 393, 591-594 (1998); Egawa, T. et al., *Immunity* 15, 323-334 (2001); Ara, T. et al., *Immunity* 19, 257-267 (2003); Sugiyama, T. et al., *Immunity* 25, 977-988(2006); Kohara, H. et al., *Blood* 110, 4153-4160 (2007); Noda, M. et al., *Blood* 117, 451-458 (2011)).

On the other hand, we have identified a small population of non-hematopoietic cells expressing high amounts of CXCL12, termed CXCL12-abundant reticular (CAR) cells with long processes. We have revealed that CAR cells were scattered throughout bone marrow and that most HSCs, early B cell precursors, the end-stage B lymphocytes, plasma cells, pDCs and NK cells were attached to the processes of CAR cells, suggesting that CAR cells function as the special microenvironments, termed 'niches' for HSCs and immune cells (Tokoyoda, K. et al., *Immunity* 20, 707-718(2004), Sugiyama, T. et al., *Immunity* 25, 977-988(2006)). In addition, we generated mice that allow selective ablation of CAR cells within bone marrow and determined the nature and in vivo function of CAR cells as a niche for HSCs and lympho-hematopoietic progenitors (Omatsu, Y. et al., *Immunity* 33, 387-399 (2010)). Short-term ablation of CAR cells in vivo did not affect candidate niches, bone-lining osteoblasts or endothelial cells but severely impaired

the adipogenic and osteogenic differentiation potential of marrow cells and production of SCF and CXCL12, and led to a marked reduction in cycling lymphoid and erythroid progenitors. HSCs from CAR cell-depleted mice were reduced in number and cell size, were more quiescent and had increased expression of early myeloid selector genes, similar to the phenotype of wild-type HSCs cultured without a niche. Thus, the niche composed of adipo-osteogenic progenitors is required for production of CXCL12 and SCF, proliferation of HSCs and lymphoid and erythroid progenitors as well as maintenance of HSCs in an undifferentiated state (Omatsu, Y. et al., *Immunity* 33, 387-399 (2010); Nagasawa, T. et al., *Trends Immunol.* 32, 315-320 (2011)). Recently, Ding et al., reported that cells which expressed high levels of SCF preferentially expressed the receptor for leptin (*lepr*) and that the numbers of HSCs were reduced by about 5-fold when SCF was conditionally deleted from leptin-expressing cells (Ding, L. et al., *Nature* 481, 457-462 (2012)). We have confirmed that *lepr* is preferentially expressed in CAR cells. Thus, the results shown by Ding et al., support the idea that CAR cells function as a niche for HSCs. We are studying the molecular basis of development and maintenance of niches for hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) (Omatsu, Y. et al., *Nature* in press).

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

(\*corresponding author)

Li, W., Kohara, H., Uchida, Y., James, J. M., Soneji, K., Cronshaw, D. G., Zou, Y.R., Nagasawa, T., \*Mukoyama, Y. S. Peripheral Nerve-Derived CXCL12 and VEGF-A Regulate the Patterning of Arterial Vessel Branching in Developing Limb Skin. *Dev. Cell* 24; 359-371, 2013.

Greenbaum, A., Hsu, Y. M., Day, R. B., Schuettelpelz, L. G., Christopher, M. J., Borgerding, J. N., Nagasawa, T., \*Link, D. C. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495; 227-230, 2013.

Nakagawa, R., Togawa, A., Nagasawa, T., \*Nishikawa, S. Peyer's patch inducer cells play a leading role in the formation of B and T cell zone architecture. *J. Immunol.* 190; 3309-3318, 2013.

Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L. A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L. E., Weber, C., Nagasawa, T., Frenette, P. S., Castrillo, A., \*Hidalgo, A. Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance. *Cell* 153; 1025-1035, 2013.

Matsumura, K., Nakase, H., Kosugi, I., Honzawa, Y., Yoshino, T., Matsuura, M., Kawasaki, H., Arai, Y., Iwashita, T., Nagasawa, T., \*Chiba, T.

Establishment of a novel mouse model of ulcerative colitis with concomitant cytomegalovirus infection: in vivo identification of cytomegalovirus persistent infected cells.

*Inflamm. Bowel Dis.* 19; 1951-1963, 2013.

Aronovich, A., Nur, Y., Shezen, E., Rosen, C., Zlotnikov Klionsky, Y., Milman, I., Yarimi, L., Hagin, D., Rechavi, G., Martinowitz, U., Nagasawa, T., Frenette, P. S., Tchorsh-Yutsis, D., \*Reisner, Y.

A novel role for factor VIII and thrombin/PAR1 in regulating hematopoiesis and its interplay with the bone structure.

*Blood* 122 ; 2562-2571, 2013.

Devi, S., Wang, Y., Chew, W. K., Lima, R., A-González, N., Mattar, C. N., Chong, SZ., Schlitzer, A., Bakocevic, N., Chew, S., Keeble, JL., Goh, CC., Li, JL., Evrard, M., Malleret, B., Larbi, A., Renia, L., Haniffa, M., Tan, SM., Chan, JK., Balabanian, K., Nagasawa, T., Bachelier, F., Hidalgo, A., Ginhoux, F., Kubes, P., \*Ng, LG.

Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J. Exp. Med.* 210 ; 2321-2336, 2013

Bannard, O., Horton, R. M., Allen, C. D., An, J., Nagasawa, T., \*Cyster, J. G.

Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* 39 ; 912-924, 2013.

## 2) 和文総説

長澤丘司, “骨髄ニッチと造血” 医学のあゆみ「骨免疫学」(別冊), pp. 67-73 (2013)

長澤丘司, “造血系とケモカインシステム” 血液フロンティア Vol.23, pp. 41-49 (2013)

長澤丘司, “骨髄の造血微小環境～造血幹細胞ニッチを形成する細胞たち” 癌と骨, 松本俊夫, 米田俊之編メディカルレビュー社, pp. 59-67 (2013)

長澤丘司, “造血幹細胞のニッチと骨代謝” Bone Vol. 27, pp. 41-47 (2013)

長澤丘司, “組織幹細胞の stemness とニッチ” 腎と透析 Vol. 75, pp. 807-815 (2013)

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 招待講演(海外)

T. Nagasawa, YM-Kyoto Symposia. “Microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow-The adipo-osteogenic progenitors, CXCL12-abundant reticular (CAR) cells-” (April 5, 2013, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan)

T. Nagasawa, International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Symposium : Stem cell niche and cell therapy. “The Adipo-osteogenic progenitor CXCL12-abundant reticular (CAR) cells function as niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow” (October 9, 2013, COEX, Seoul, Korea)

T. Nagasawa, Swiss-Kyoto Symposium. “Microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow” (November 22, 2013, ETH Zurich, Zurich, Switzerland)

### 招待講演(国内)

長澤丘司, さきがけ第4回領域会議, CREST 慢性炎症講演「炎症の慢性化機構の解明と制御」研究領域(2013/1/7 ホテルモントレ グラスミア大阪 大阪)

長澤丘司, 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム 骨髄幹細胞ニッチと神経-免疫-内分泌クロストーク “骨髄の造血幹細胞ニッチと脂肪・骨前駆細胞 CAR 細胞”(2013/3/28 サンポートホール高松・かがわ国際会議場 高松)



T. Nagasawa, The 6<sup>th</sup> International workshop of Kyoto T cell conference. “The adipo-osteogenic progenitors function as niches for hematopoietic stem and progenitor cells in the marrow” (2013/6/3-7 京都大学芝蘭会館 京都)

長澤丘司, 第23回日本サイトメトリー学会 学術集会 シンポジウム4 再生と炎症, 新たな展望 “骨髄の造血幹細胞・前駆細胞ニッチェ”(2013/6/22 日本医科大学橋桜会館 東京)

T. Nagasawa, Omatsu,Y., Sugiyama,T. 第42回日本免疫学会学術集会 シンポジウム Osteoimmunology “The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow”(2013/12/13 幕張メッセ 千葉)

# 生体組織工学研究部門

## 生体分子設計学分野 Department of Cellular Differentiation

分野主任 教授 開 祐司

*Prof. Yuji Hiraki*

### 【研究概要】

本研究分野では、組織血管化、軟骨・腱・靭帯形成とその再生修復の分子機構の解明を主たるテーマとして、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュなどの動物モデル、細胞培養系を駆使して分子レベルでの解析を行っている。現在の研究テーマは、以下の通りである。

#### 1. Chondromodulin-I に関する研究

##### (1) 血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) の血管内皮細胞に対する作用に関する研究

我々は、ウシ胎仔骨端軟骨から血管新生抑制因子 ChM-I を精製・クローニングした。ChM-I は主に軟骨や心臓弁などの無血管に保たれる間葉組織に特異的に発現し、血管内皮細胞の遊走・増殖・管腔形成阻害活性を示す。さらに、ChM-I ノックアウトマウスの解析では、加齢に伴い心臓弁に異常な血管化が惹起されることから、ChM-I が組織の無血管性の維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、血管内皮細胞に対する ChM-I の作用機序については十分に解析されていない。そこで、組換えヒト ChM-I タンパク質 (rhChM-I) を調製し、ChM-I によって誘導される最も初期の血管新生抑制応答である細胞遊走の阻害作用について詳細に検討した。rhChM-I は Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) のみならず、Fibroblast Growth Factor-2 や Insulin-like Growth Factor-I など種々の遊走刺激へのヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) のケモタキシスを阻害した。rhChM-I 存在下では VEGF-A 刺激に伴う HUVECs のアクチン細胞骨格および接着斑の再構成は著明に阻害され、Rac1 およびアクチン脱重合因子 cofilin の活性制御に異常が認められた。これらの結果を支持するように、タイムラプスにより HUVECs の細胞運動を観察すると、rhChM-I 処理細胞では VEGF-A によって誘導される持続的な葉状仮足の形成が阻害され、一過性の仮足形成が高頻度に認められると共に、細胞の移動速度、定方向性が共に顕著に低下していた。以上の結果より、ChM-I は刺激依存的なアクチン細胞骨格の再構成を阻害することにより葉状仮足の伸長を不安定化して、細胞の運動性を抑制することが明らかとなった。このような遊走阻害作用は線維芽細胞などに対してはほとんど認められず、種々の血管内皮細胞において選択的に認められたことから、ChM-I の作用は血管内皮細胞に対する特異的な作用機序を介していると考えられた。

##### (2) ChM-I の活性ドメイン構造に関する研究

ChM-I は 120 アミノ酸から成る糖タンパク質で、N 型糖鎖結合部位を含む N 末端側の親水性ドメイン (ドメイン 1) と、C 末端側にある疎水性のシステインリッチドメイン (ドメイン 2) から構成されている。我々はこれまでに CHO 細胞や 293-F 細胞などの哺乳細胞発現系を用いて糖鎖修飾されているヒト組換え ChM-I タンパク質 (G-hChM-I) を発現させ、軟骨細胞および血管内皮細胞に対する生物活性を明らかにしてきた。一方、大腸菌 *E. coli*

を用いてヒト組換え ChM-I タンパク質を発現させると、糖鎖修飾を欠いた ChM-I (NG-hChM-I) を得ることができ、G-hChM-I と同様に、NG-hChM-I は弱いながら軟骨細胞のコロニー形成促進作用および血管内皮細胞の管腔形成阻害作用を示した。この活性は V8 プロテアーゼによる限定分解によって糖鎖修飾部位を含むドメイン 1 の一部を欠失させた  $\Delta$ N-hChM-I においてもほとんど変わらないことから、ドメイン 2 が ChM-I の活性ドメインであることが示唆された。これらのタンパク質の CD (Circular Dichroism) スペクトルを測定し、二次構造を解析した結果、ドメイン 1 内の糖鎖修飾はタンパク質の溶解性だけでなく、ChM-I が活性なドメイン構造を獲得するのに必要な機能ドメインであることが明らかとなった。現在、変異体タンパク質および合成ペプチドを用いて活性ドメイン構造の解析を進めている。ChM-I は、関連遺伝子である Tenomodulin を除くと、これまでに知られている血管新生抑制因子とホモロジーを示さないことから、その活性ドメインは血管新生抑制活性を有する新たなペプチド薬として応用が期待される。

## 2. 軟骨と腱/靱帯の連結部の構築における $Scx^+/Sox9^+$ 前駆細胞の役割の解析

脊椎動物が体を動かすためには、骨格・筋・腱の緊密で機能的かつ物理的な連結が不可欠である。腱は筋と骨格を連結することで、メカニカルトランスミッターとして機能し、一方、靱帯は骨と骨を連結することで関節の安定化を担う。軟骨・筋・腱・靱帯などの各コンポーネントは、筋骨格系の発生初期にまず独立した原基として形成さ

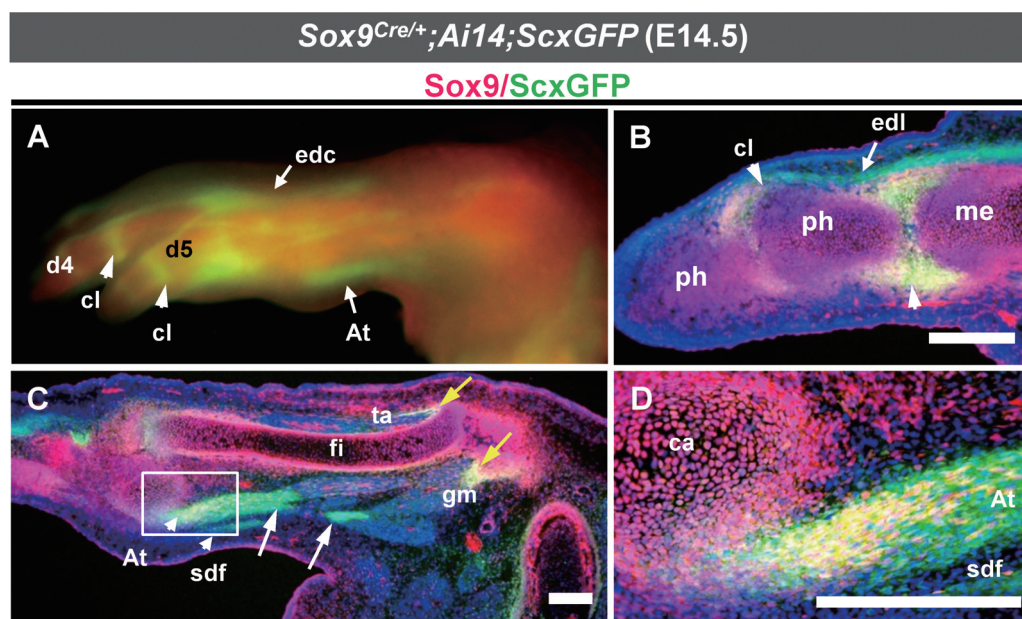


図1  $Scx^+/Sox9^+$ 細胞の靱帯と腱の付着部形成への寄与

(A-D)  $Scx$ を発現している腱・靱帯(GFP, 緑)と  $Sox9$ を発現した細胞の履歴(tdTomato, 赤)を胎生 14.5 日の  $Sox9^{Cre/+}; Ai14; ScxGFP$  マウスにおいて解析した。矢印と矢頭はそれぞれ腱と靱帯を示している。(A)後肢の外側像を示す。(B-D)後肢の矢状断を示す。Bは関節予定領域を含む指を示している。Cの白と黄色の矢印は、それぞれ下腿部の force-transmitting tendon と anchoring tendon を示している。DはCの四角で囲まれた領域の強拡大像。At, アキレス腱; ca, 踵骨; cl, 側副靱帯; d4, 第四指; d5, 第五指; edl, 長趾伸筋腱; fe, 大腿骨; fi, 腓骨; gm, 腓腹筋; me, 中足骨; ph, 指骨; sdf, 浅指屈筋腱; ta, 前脛骨筋; ti, 脛骨。スケールバーは 200  $\mu$ m を示す

Fig. 1 Contribution of the  $Scx^+/Sox9^+$  cell lineage to the formation of ligaments and the enthesal side of tendons

(A-D) Distribution of  $Scx$ -expressing tendons and ligaments (GFP, green) with a  $Sox9$  expression history (tdTomato, red) were analyzed in a  $Sox9^{Cre/+}; Ai14; ScxGFP$  mouse embryo at E14.5. Arrows and arrowheads indicate tendon and ligaments, respectively. (A) Lateral view of the hindlimb. (B-D) Sagittal sections of the hindlimb. The developing digit with the prospective digital joints is shown in B. White and yellow arrows in C indicate the force-transmitting and the anchoring tendons at the lower leg respectively. The boxed region in C is shown at a higher magnification in D. (At, Achilles tendon; ca, calcaneus; cl, collateral ligament; d4, digit 4; d5, digit 5; edl, extensor digitorum longus tendon; fe, femur; fi, fibula; gm, gastrocnemius muscle; me, metacarpal; ph, phalanx; sdf, superficial digital flexor tendon; ta, tibial anterior muscle; ti, tibia) Scale bars: 200  $\mu$ m.

れる。その後、組織形成の進行に伴って各コンポーネントは連結されるが、そのメカニズムは明らかにされていない。

SRY-box containing gene 9 (Sox9) と Scleraxis (Scx) はそれぞれ軟骨形成と腱形成に不可欠な転写因子であるが、一部の腱・靭帯前駆細胞や軟骨前駆細胞においては、筋骨格系形成初期に Sox9 と Scx が共に発現している。そこで、ScxCre マウスとレポーターマウスを交配して Scx 陽性細胞の系譜を解析すると、Scx 陽性である軟骨前駆細胞が軟骨と腱/靭帯の連結部付近の軟骨細胞に分化することが明らかとなった。

また、Scx の発現領域において Sox9 陽性細胞の系譜を解析した結果、Scx 陽性細胞は Sox9 の発現履歴により、Scx<sup>+</sup>/Sox9<sup>+</sup> 前駆細胞と Scx<sup>+</sup>/Sox9<sup>-</sup> 前駆細胞の二つの集団に分かれることが明らかとなった。腱細胞は Scx<sup>+</sup>/Sox9<sup>+</sup> 及び Scx<sup>+</sup>/Sox9<sup>-</sup> 前駆細胞に由来しており、軟骨原基に近づくほど多くの腱細胞が Scx<sup>+</sup>/Sox9<sup>+</sup> に由来していた。靭帯細胞と椎間板の線維輪の細胞は Scx<sup>+</sup>/Sox9<sup>+</sup> 細胞に由来していた。さらに、Scx<sup>+</sup>/Sox9<sup>+</sup> 細胞において特異的に Sox9 を欠失させると、軟骨と腱/靭帯の連結部や椎間板の線維輪において低形成や欠損が認められた。これらの結果から、Scx<sup>+</sup>/Sox9<sup>+</sup> 細胞群は腱細胞・靭帯細胞・軟骨細胞となる多能性を有し、軟骨と腱/靭帯の連結部の構築に寄与することが明らかとなった。

### 3. Pax1 による軟骨細胞の分化成熟の抑制

椎骨の軟骨性骨原基の形成に伴って軟骨では低下し、軟骨膜と椎間板に局限した。軟骨細胞のマスター遺伝子である SRY-box containing gene 9 (Sox9) は、軟骨だけでなく椎間板でも発現し、形成過程の脊柱では椎間板において Pax1 と重複した発現パターンを示した。ニワトリ胚の前肢に Pax1 を強制発現させた結果、軟骨形成の初期過程には影響が認められなかったものの、軟骨細胞の成熟及び内軟骨性骨形成が阻害され、軟骨の成長が著しく抑制された。Pax1 を強制発現した軟骨細胞では、プロテオグリカンの蓄積が減少し、Agg 椎骨の軟骨性骨原基の形成に伴って軟骨では低下し、軟骨膜と椎間板に局限した。軟骨細胞のマスター遺伝子である SRY-box containing gene 9 (Sox9) は、軟骨だけでなく椎間板でも発現し、形成過程の脊柱では椎間板において Pax1 と重複した発現パターンを示した。ニワトリ胚の前肢に Pax1 を強制発現させた結果、軟骨形成の初期過程には影響が認められなかったものの、軟骨細胞の成熟及び内軟骨性骨形成が阻害され、軟骨の成長が著しく抑制された。Pax1 を強制発現した軟骨細胞では、プロテオグリカンの蓄積が減少し、Aggrecan (Agc1) の著しい発現低下が認められた。培養軟骨細胞において Pax1 を強制発現した結果、細胞形態が軟骨細胞に特徴的な多角型から線維芽細胞様の紡錘型へと変化した。また、Pax1 の強制発現により、培養軟骨細胞における Sox9, Nkx3.2, Indian hedgehog, type II collagen, Chondromodulin-1 及び Agc1 といった軟骨マーカー遺伝子の発現が顕著に低下した。Pax1 と同時に Sox9 を強制発現した軟骨細胞では、Pax1 を単独で強制発現した場合と比較して、軟骨マーカー遺伝子の発現がわずかに上昇したが、軟骨細胞の特徴はほとんど回復しなかった。以上の結果から、Pax1 が軟骨細胞の成熟過程を阻害することが明らかになり、Sox9 の機能に対して Pax1 が抑制的に作用することが示唆された。

### 4. ゼブラフィッシュ胚の生体蛍光イメージング技術を用いた無血管な軟骨組織形成プロセスの可視化

胚が透明で発生早いゼブラフィッシュの軟骨および血管を蛍光タンパク質により可視化することで、発生過程において間葉組織中に無血管な軟骨組織が形成されるプロセスを解析している。マウスでは、Col2a1 遺伝子の軟骨組織特異的な発現は、SRY-box 9 (Sox9) が結合する第 1 イントロン内の 48bp からなるエンハンサーによって制御されている。このエンハンサーの 4 回繰り返し配列を Zebrafish enhancer detection (ZED) vector に組み込み、Tol2 トランスポゾンを用いて、軟骨で Enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現するトランスジェニック



フィッシュの系統(*col2a1 : GFP*)を確立した。*col2a1 : GFP* では、生後2日目から頭部や胸ヒレに出現する軟骨細胞でEGFPの発現が認められ、生後21日目幼魚の軟骨組織においてもEGFPの発現が検出された。また、*flkl (vegfr 2)* 遺伝子の血管内皮細胞特異的発現制御領域を用いて、血管を赤色蛍光蛋白質であるmCherryによって可視化したトランスジェニックフィッシュの系統(*flkl : mCherry*)を確立した。この*flkl : mCherry* と *col2a1 : GFP* を交配することで、軟骨組織と血管を同時に蛍光観察可能なダブルトランスジェニックフィッシュ(*col2a1 : GFP ; flkl : mCherry*)を作成することが可能となった。現在、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、*col2a1 : GFP ; flkl : mCherry* の胸ヒレの軟骨形成領域と血管網の相互作用について解析を進めている。

The proper growth and differentiation signaling from the surrounding extracellular environment regulates tissue formation and its functions. We are aiming at the elucidation of molecular interactions and signaling networks underlying vascularization of mesenchymal tissues and formation of skeletal tissues such as cartilage, bone and tendon/ligaments. Our current research efforts are focused on the following studies.

### 1. Functional analysis of Chondromodulin-I (ChM-I)

#### (1) The inhibitory actions of ChM-I on the motility of vascular endothelial cells

We have previously purified and cloned ChM-I as an angiogenesis inhibitor from fetal bovine cartilage based on the growth inhibitory activity of vascular endothelial cells (ECs). ChM-I is expressed in the avascular zones of cartilaginous molds and cardiac valves, and has been shown to inhibit the migration, proliferation, and tube morphogenesis of cultured ECs. The aged mice lacking ChM-I exhibit abnormal angiogenesis in cardiac valves, suggesting the essential role of ChM-I in maintaining the tissue avascularity. Despite these evidences showing the activity of ChM-I *in vivo* and *in vitro*, the molecular mechanism of the ChM-I actions remains to be elucidated. To address this issue, we have prepared recombinant human ChM-I (rhChM-I) and examined its effects on migration of ECs, an early regulatory step in angiogenesis. In a modified Boyden chamber assay, ChM-I inhibited the chemotactic migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) as well as by Fibroblast Growth Factor-2 and Insulin-like Growth Factor-I. The inhibitory action involved the disturbed reorganization of actin cytoskeleton and focal adhesions in VEGF-A-stimulated ECs. We found that rhChM-I suppressed the VEGF-A-induced activation of Rac1 and the phosphorylation of cofilin, which leads to the dysregulation of actin polymerization. Consistent with these observations, time-lapse microscopic analysis revealed that ChM-I inhibited the persistent extensions of lamellipodia and evoked frequent alterations of moving front in a consistent manner with the reduced motility and directionality of ECs upon VEGF-A stimulation. These data showed that ChM-I impaired the VEGF-A-stimulated motility of ECs through the destabilization of lamellipodial extensions. The inhibitory action was selective to the endothelial cell type, but not to other cell types such as fibroblastic cells, suggesting that ChM-I acts through an endothelial cell-specific signal pathway that regulates the motility of ECs.

#### (2) The analysis of domain structure of ChM-I

ChM-I is a glycoprotein consisting of the N-terminal hydrophilic domain with an N-glycosylation site (domain 1), and a hydrophobic cysteine-rich domain located at the C-terminus (domain 2). Domain 2 is well conserved across species and is highly similar to the C-terminal cysteine-rich domain of Tenomodulin (Tnmd), a ChM-I related angio-

genesis inhibitor. Using a glycosylated form of recombinant human ChM-I (G-hChM-I) expressed in CHO cells or 293-F cells, we have demonstrated the various bioactivities of ChM-I on chondrocytes and vascular endothelial cells. On the other hand, the non-glycosylated form of human ChM-I expressed in *E. coli* (NG-hChM-I) exhibited the similar bioactivity, but the activity was obviously lower than that of G-hChM-I. Truncation of the domain 1 containing the N-glycosylation site by limited digestion with V8 protease had no apparent effect on the bioactivity of NG-hChM-I, indicating that the domain 2 is an active domain of this protein. Circular dichroism (CD) measurement revealed that N-glycosylation in domain 1 is critical for the structural integrity for biological function as well as the protein solubility. Current works focus on the analysis of active domain of ChM-I using its mutant proteins and synthetic peptides. So far, no sequence and structural similarity of ChM-I and Tnmd to any known angiogenesis inhibitor has been reported. Thus, the active domain of ChM-I is expected to be a novel anti-angiogenic peptide drug with promising activity for the angiogenesis-related diseases including solid tumors and rheumatoid arthritis.

## **2. Analysis of the contribution of $Scx^+/Sox9^+$ progenitors to the establishment of the junction between cartilage and tendon/ligament**

In vertebrates, coordinated body movement is ensured by a close functional and physical association of bones, muscles, tendons and ligaments. Tendons connect muscles to the skeletal components and function as force transmitters, whereas ligaments bind bones together to stabilize joints. During the early stages of musculoskeletal development, cartilage, muscle, tendon and ligament primordia initially develop as an individual unit, but subsequently they are integrated with each other by an unknown mechanism.

SRY-box containing gene 9 (*Sox9*) and scleraxis (*Scx*) regulate cartilage and tendon formation, respectively. At the early stages of musculoskeletal development, both *Sox9* and *Scx* are detected in the subpopulation of tendon/ligament progenitors and chondroprogenitors. Lineage analysis crossing *ScxCre* transgenic mice with reporter mice revealed that  $Scx^+$  chondroprogenitors differentiate into chondrocytes near the chondro-tendinous/ligamentous junction during development.

*Sox9* lineage tracing in the  $Scx^+$  domain revealed that  $Scx^+$  progenitors can be subdivided into two distinct populations with regard to their *Sox9* expression history:  $Scx^+/Sox9^+$  and  $Scx^+/Sox9^-$  progenitors. Tenocytes are derived from  $Scx^+/Sox9^+$  and  $Scx^+/Sox9^-$  progenitors. The closer the tendon is to the cartilaginous primordium, the more tenocytes arise from  $Scx^+/Sox9^+$  progenitors. Ligamentocytes as well as the annulus fibrosus cells of the intervertebral discs are descendants of  $Scx^+/Sox9^+$  progenitors. Conditional inactivation of *Sox9* in  $Scx^+/Sox9^+$  cells causes defective formation in the attachment sites of tendons/ligaments into the cartilage, and in the annulus fibrosus of the intervertebral discs. Thus, the  $Scx^+/Sox9^+$  progenitor pool is a unique multipotent cell population that gives rise to tenocytes, ligamentocytes and chondrocytes during the establishment of the chondro-tendinous/ligamentous junction.

## **3. Inhibitory action of *Pax1* on chondrocyte maturation.**

Paired box gene 1 (*Pax1*) indirectly promotes the early stages of chondrogenic differentiation through induction and transactivation of *Nk3 homeobox 2* (*Nkx3.2*), a transcriptional repressor. Later in chondrogenic differentiation, *Nkx3.2* blocks chondrocyte hypertrophy by repressing *Runt-related transcription factor 2* (*Runx2*). We demon-

strate that *Pax1* acts as a negative regulator of chondrocyte maturation, independently of *Nkx3.2*. Upon cartilage formation, *Pax1* expression in the ventral sclerotome was gradually decreased except for the perichondrial region of the vertebral bodies and the intervertebral region, both of which express *SRY-box containing gene 9* (*Sox9*). Forced expression of *Pax1* in the chick forelimb resulted in the formation of shortened skeletal elements with a significant reduction of proteoglycan accumulation in cartilage as well as a lack of the cortical bone formation and vascular invasion into primary ossification center. *Pax1*-misexpressing chondrocytes exhibited aberrant cell morphology with marked downregulation of *Aggrecan* (*Agc1*). Cultured *Pax1*-misexpressing chondrocytes failed to accumulate cartilaginous proteoglycans and became fibroblastic, in association with the marked downregulation of the expression of *Sox9*, *Nkx3.2*, *Indian hedgehog*, *type II collagen*, *Chondromodulin-1* as well as *Agc1*. In cultured chondrocytes, reduced accumulation of cartilaginous proteoglycans induced by the forced expression of *Pax1* was partially rescued by *Sox9* overexpression, but further promoted by *Nkx3.2* overexpression. Thus, the chondrogenic action of *Sox9* was antagonized by *Pax1*, which is downregulated during chondrogenic differentiation.

#### 4. Live imaging of avascular cartilage formation in zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) is a powerful tool to analyze vertebrate embryogenesis due to the optical transparency of the living embryos. We analyze interactions between cartilage and blood vessels during zebrafish embryonic development by live imaging of fluorescent transgenic zebrafish lines. Cartilage-specific expression of mouse *col2a1* gene is regulated by the SRY box-9 (*Sox9*)-binding 48 bp enhancer element in the first intron of the gene. Taking advantage of Tol2 transposon and *Zebrafish enhancer detection* (*ZED*) vector containing four tandem repeats of the 48 bp *col2a1* enhancer element, we have established a transgenic zebrafish line, *col2a1 : GFP*. In *col2a1 : GFP* at 2 days post fertilization (dpf), GFP expression was detected in cartilaginous elements such as pharyngeal arch and pectoral fin. Even at 21 dpf, EGFP was still detected in cartilaginous elements of *col2a1 : GFP* larvae. For visualization of the vascular network, we have also established a transgenic fish line, *flk1 : mCherry* that express red fluorescent protein, mCherry, under the control of promoter/enhancer elements of zebrafish *flk1/vegfr2* gene. We then obtained double transgenic *col2a1 : GFP ; flk1 : mCherry* by crossing *col2a1 : GFP* with *flk1 : mCherry*. These double transgenic *col2a1 : GFP ; flk1 : mCherry* enabled us to monitor both cartilage and blood vessel formation simultaneously. With confocal laser microscopy, we are currently investigating the formation of avascular cartilage with a focus on pectoral fin development.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Takimoto A, Mohri H, Kokubu C, Hiraki Y, and Shukunami C : *Pax1* acts as a negative regulator of chondrocyte maturation. *Exp. Cell Res.*, **319**(20): 3128-3139 (2013)

Sugimoto Y, Takimoto A, Hiraki Y, Shukunami C : Generation and characterization of *Scx*Cre transgenic mice. *Genesis*, **51**(4): 275-283 (2013)

Sugimoto Y, Takimoto A, Akiyama H, Kist R, Scherer G, Nakamura T, Hiraki Y, Shukunami C : *Scx*<sup>+</sup>/*Sox9*<sup>+</sup> pro-

genitors contribute to the establishment of the junction between cartilage and tendon/ligament. *Development*, **140**(11): 2280-2288 (2013)

Komiyama Y, Ohba S, Shimohata N, Nakajima K, Hojo H, Yano F, Takato T, Docheva D, Shukunami C, Hiraki Y, Chung UI: Tenomodulin expression in the periodontal ligament enhances cellular adhesion. *PLoS One*, **8**(4): e60203 (2013)

Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Takahashi A, Guo L, Dai J, Qiu X, Sharma S, Takimoto A, Ogura Y, Jiang H, Yan H, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Hosono N, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Yonezawa I, Londono D, Gordon D, Herring JA, Watanabe K, Chiba K, Kamatani N, Jiang Q, Hiraki Y, Kubo M, Toyama Y, Tsunoda T, Wise CA, Qiu Y, Shukunami C, Matsumoto M, Ikegawa S: Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat. Genet.*, **45**(6): 676-679 (2013)

## 2) 総 説

宿南知佐：腱・靱帯形成の制御メカニズム。 *Pharma Medica*, **31**: 43-46 (2013)

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

滝本 晶, 國府 力, 開 祐司, 宿南知佐：椎間板形成過程における Pax1 の役割。第 14 回運動器科学研究会 (2013. 9. 13-14. 東京)

杉本由紀：Scx<sup>+</sup>/Sox9<sup>+</sup>前駆細胞は軟骨と腱/靱帯の連結部の構築に寄与する。第 14 回運動器科学研究会 (2013. 9. 13. 東京)

川津正慶, 岩崎将也, 清流正弘, 池田悦子, 滝本 晶, 宿南知佐, 山本照子：歯根膜細胞における伸展刺激に応答した Scleraxis 発現調節メカニズムの解析。第 72 回日本矯正歯科学会大会 (2013. 10. 9. 松本)

滝本 晶：Pax1 により制御される脊柱組織構築の分子メカニズム。第 16 回骨代謝研究会 (2013. 11. 30. 東京)

山下 寛, 宿南知佐, 開 祐司：ゼブラフィッシュを用いた Chondromodulin-I の軟骨特異的な転写制御機構の解析。第 36 回日本分子生物学会年会 (2013. 12. 4. 神戸)

#### 2) 講演・シンポジウム

宿南知佐：Molecular mechanisms underlying the formation of tendon and ligament, 第 2 回バイオデンタル・コロシウム (2013. 8. 31. 広島)

宿南知佐：腱・靱帯と硬組織の連結を制御する分子機構, 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会シンポジウム 8 「骨関節の再生医療の現状と展望」 (2013. 10. 18. 千葉)



## 生体材料学分野 Department of Biomaterials

分野主任 教授 田畑 泰彦

*Prof. Yasuhiko Tabata*

### 【研究概要】

本研究分野の目的は、医療(治療、診断、予防)に応用可能あるいは基礎生物医学研究に役立つ方法、手段、および技術を材料科学の立場に立って研究開発していくことである。生体材料(バイオマテリアル)とは、体内で使用したり、あるいはタンパク質、細胞などの生体成分と接触した状態で用いられる材料のことであり、本研究分野においては、高分子、金属、セラミックス、およびそれらのコンポジットからなる生体材料のデザインと創製を行い、得られた生体材料の基礎生物医学および医療への応用を目指している。具体的には、生体組織・臓器の再生治療(一般には、再生医療と呼ばれている)および再建外科治療に用いられる医用材料、人工臓器のための生体材料、あるいは薬物・遺伝子治療、予防ワクチン、および診断(分子イメージング)効率の向上を目指したドラッグデリバリーシステム(DDS)のための生体材料の研究開発を行っている。加えて、幹細胞の分子生物学、生化学、細胞生物学の研究、および細胞培養のために必要不可欠な生体材料についての研究開発も進めている。

再建外科治療をアシストする生体材料の生体適合性はまだまだ低く、その代行できる生物機能も単一であることから、臨床上、患者に高い Quality of Life (QOL) を与えることが困難である場合が多い。また、臓器移植もドナー不足に加えて、免疫拒絶抑制剤の副作用にともなう問題もある。このように、再建外科と臓器移植との現在の2大先端外科治療に限界が見えてきている。このような状況の中で生まれてきたのが再生治療である。再生医療とは、生体本来のもつ自然治癒力を介する医療である。自然治癒の基は細胞の増殖・分化能力であり、この細胞能力を高めることによって病気を治す。再生医療には病気を治す再生治療と将来の治療を科学的に支える再生研究がある。再生研究には、細胞能力を調べる細胞研究と細胞を用いて薬の作用や毒性を調べる創薬研究がある。再生治療の試みが医療応用できるようになれば、再建外科と臓器移植治療に続く第3の治療法となることは疑いない。この再生治療は生体材料に依存しない点、免疫抑制剤を必要としない点で、前述の2大治療法とは大きく異なる。再生治療の目的は、細胞の増殖分化能力を利用した生体組織の再生誘導と臓器機能の代替による病気の治療である。通常、体内では細胞はその周辺環境と相互作用することによって生体、生物機能を発現している。そのため、いかに良い細胞が入手できても、細胞の周辺環境が整っていなければ細部機能は望めない。再生治療の実現には、再生現象にかかわる増殖・分化ポテンシャルの高い(幹)細胞とその周辺環境の基礎生物医学研究が必要であることはいうまでもないが、それに加えて、細胞の増殖、分化を促し、生体組織の再生を誘導するための環境(場)を与えることが不可欠である。別な言い方をすれば、再生治療とは、細胞やその周辺環境をうまく設定することによって、本来、体のもっている自然治癒力を高めて、病気の治療を行うという、体にやさしい理想的な治療法である。この生体組織(Tissue)の再生誘導の場を構築するための医工学(Engineering)的な技術・方法論が生体組織工学(Tissue Engineering)である。

生体組織工学の基本アイデアは、生体組織の構成成分である細胞、細胞の増殖・分化のための足場、および生体シグナル因子(細胞増殖因子と遺伝子)をうまく組み合わせていくことによって、生体組織の再生誘導を実現することである。このためには生体材料の利用が必要不可欠であり、特に、体内で分解吸収され消失する材料(生体吸収

性材料)と3つの要素とを組み合わせ、生体組織の再生を誘導する。この再生誘導に適切な生体吸収性を金属やセラミックスにもたせることは難しく、この観点から、生体組織工学では主として高分子材料が利用されることが多い。生体吸収性材料の利点は、材料の体内での役割が果たされた後に、その場から消失するため、再び取り除く必要がなく、また、材料が吸収されるために、材料が生体組織・臓器の再生過程を妨げないことである。生体材料が生体組織の再生修復とともに吸収されれば、材料に対する問題となる生体反応の心配もなく、また、生体材料が体内に存在する細胞を活性化し、病気を治すことができれば、免疫拒絶反応もなく、理想的な治療法となる。DDS(ドラッグデリバリーシステム、薬物送達法)および生物医学研究のための材料にも生体吸収性が要求される場合が多い。再生治療の実現に必要な細胞能力の解明には再生研究が重要である。前述の生体材料技術は再生研究にも応用可能である。

本研究分野では、生体吸収性の高分子材料を中心とした生体組織・臓器の再生治療と再生研究のための生体材料、薬物、遺伝子治療、予防、診断、などに必要な DDS のための生体材料、分子生物学、生化学、細胞生物学、細胞培養、および幹細胞研究(再生研究)のための生体材料、あるいは外科および内科治療補助のための生体材料の研究を行っている。以下にその内容をより詳しく述べる。

### 1) 生体組織の再生治療のための生体材料

血液細胞以外のほとんどの細胞は、体内では細胞外マトリックス(タンパク質と多糖からなる3次元のハイドロゲル様構造体)と呼ばれる増殖・分化のための足場材料に接着して存在、その生物機能を発現している。そのため、生体組織が大きく欠損した場合には、この足場も失われるため、欠損部に細胞のみを補うだけでは生体組織の再生誘導を望めない場合が多い。そこで、再生誘導を期待する部位に細胞の増殖・分化を促すための仮の足場を与える必要がある。本研究分野では、この細胞の足場としての3次元あるいは多孔質構造をもつ生体吸収性の成形体(人工細胞外マトリックス)をデザイン、創製している。しかしながら、いかに足場が優れていても、細胞の数が少なかったり、細胞を増殖させるための生体シグナル因子が足りなければ、生体組織の再生誘導は望めないであろう。このような場合、細胞の増殖・分化を促す細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を用いるのが1つの現実的な解決法である。しかしながら、これらの生体シグナル因子は体内での寿命が短く不安定であるため、その利用には投与上の工夫が必要である。この工夫がDDSである。たとえば、生体吸収性材料に細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を包含させ、再生部位で徐々に放出(徐放)する。この徐放化技術によって、生体シグナル因子の生物活性が効率よく発揮され、その結果として、種々の生体組織・臓器の再生誘導が促進されることがわかってきている。現在、この細胞増殖因子の徐放化技術を利用した血管、骨、歯周組織などの再生誘導治療の臨床研究が始まっている。本研究分野では、再生治療に必要不可欠な細胞足場および徐放化担体のための生体材料をデザイン、創製している。

一般に、拡張型心筋症、慢性腎炎、肝硬変、肺線維症など慢性疾患では、病的部位が線維性組織で占められ、臓器機能が不全に陥っていることが多い。そこで、内科的な薬物、遺伝子治療によって、この線維性組織を消化分解することができれば、周辺の正常組織の再生誘導能によって病的部位は再生修復され、慢性線維性疾患の内科的な再生治療が実現できる。本研究分野では、このアイデアを基に病的部位への薬物・遺伝子のターゲティングおよび局所徐放化による難治性慢性線維性疾患に対する内科的再生治療を行っている。この再生治療の概念は、体のもつ自然治癒力を活用するという点で、上述の足場やDDS技術を用いた外科的再生治療と同じであり、今後は外科治療だけでなく、内科治療に対しても、重要となっていくであろう。例えば、自然治癒力を高めて、難治性慢性疾患の悪化進行を抑制することができれば、患者への福音はきわめて大きいと考えられる。

## 2) 幹細胞工学および再生研究のための生体材料

再生治療には、2つのアプローチがある。1つは前述の生体組織工学をベースとした生体組織の再生治療である。もう1つが、増殖・分化ポテンシャルの高い幹細胞を利用する細胞移植治療である。後者のためには、臨床応用可能な十分な数と質のそろった細胞を調製することが重要となる。本研究分野では、この細胞移植治療に不可欠である幹細胞、前駆細胞、および芽細胞などを効率よく得ることを目的として、それらの細胞の単離、増殖、分化のための培養基材および培養技術について研究開発を行っている。従来の細胞培養法に加えて、種々の生体材料からなる培養基材あるいは培養装置(バイオリアクタ)の組み合わせによる細胞培養技術の確立を目指している。これらの一連の研究は、単に再生治療のために利用可能な細胞を得ることを目的としているだけでなく、広く、細胞の増殖・分化、形態形成に関する生物医学の基礎研究(再生研究)にも応用できる生体材料、技術、方法論を提供することも大きな目的である。この技術は細胞を用いた薬の代謝、毒性を評価する創薬研究にも応用できる。加えて、細胞機能の解析および細胞の遺伝子改変を目的として、遺伝子導入、発現のための非ウイルスキャリアーのデザインと創製を行っている。これらの細胞に対する生体材料技術は、前項1)の治療の目的にも利用できる。

幹細胞を利用した細胞移植治療では、時として、細胞の再生誘導能力不足が問題となる場合がある。これを解決する1つの方法として、遺伝子導入による幹細胞の活性化(遺伝子による機能改変)が有望であり、広く行われている。これまでに、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入が行われているが、ウイルスを用いていることから、その臨床応用はきわめて難しい。そこで、非ウイルスキャリアーを用いた幹細胞の生物機能の活性化法の研究開発が強く望まれている。この1つの成果として、遺伝子を幹細胞内で徐放化する技術を開発した。この技術を利用することによって、ウイルスと同程度あるいはそれよりも高いレベルの遺伝子発現が実現できた。さらに、遺伝子により活性化した幹細胞を用いることによって、より高い細胞移植治療効果が認められることがわかった。また、遺伝子と非ウイルスキャリアーとが固定化された基材上で細胞を培養、さらにバイオリアクタを組み合わせることによって、細胞への遺伝子導入発現効率を高める(SubFection: substrate-mediated transfection)技術も開発した。非ウイルス性キャリアーを用いて、プラスミドDNAやsiRNAを細胞内に効率よく取り込ませ、細胞の生物機能や分化を制御することも可能となっている。これらの一連の物質導入技術は、細胞の生物機能の改変に有用であり、その対象となる物質は遺伝子だけでなく、small interfering RNA (siRNA)などの核酸物質、低分子、ペプチド、タンパク質などの細胞内導入法としても利用可能である。

体の最小単位は細胞であるが、生体機能の単位は細胞の集合体である。そのため、細胞集合体に関する研究が始まっている。しかしながら、細胞集合体サイズの増大にともない、集合体内部の細胞は酸素、栄養の供給が悪く、死滅、細胞機能の維持が困難となる。このような状況では細胞研究の発展は望めない。加えて、細胞集合体を利用した薬の開発、毒性評価(創薬研究)に対して限界が生じる。この問題を解決する方法として、生体吸収性ハイドロゲル粒子を細胞集合体内に含ませることを考えた。この方法により、細胞集合体内での状態が改善、細胞機能の向上が認められた。このような、細胞集合体に代表される細胞による組織化のための研究ツールの研究開発も進めている。

## 3) ドラッグデリバリーシステム(DDS)のための生体材料

薬物が効くのは、薬物がその作用部位に適切に作用するからである。しかしながら、現実には、薬物は部位選択性がなく、その薬理作用を発現させるために大量投与が行われている。これが薬物の副作用の主な原因となっている。そこで、薬物を必要な部位へ、必要な濃度で、必要な時期にだけ働かせるための試みが行われている。これがDDSである。DDSの目的は、薬物の徐放化、薬物の長寿命化、薬物の吸収促進、および薬物のターゲティング



などである。いずれの目的にも、薬物を修飾するための生体材料が必要である。本研究分野では、生体材料学の観点からの治療薬物と治療遺伝子のためのDDS研究を行っている。

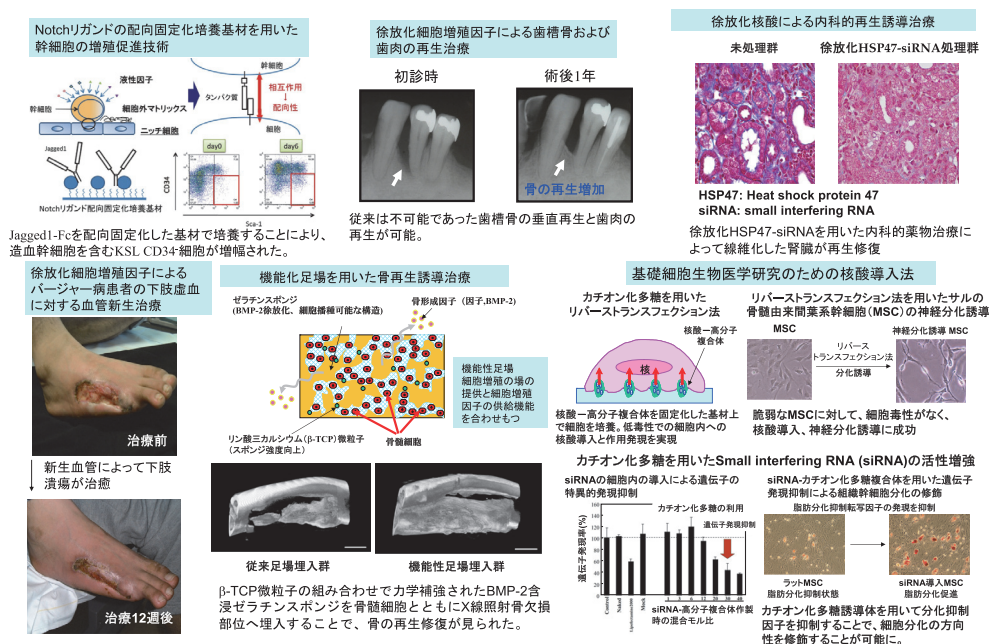
これまでの研究の経緯から、DDSの対象薬物は治療薬に集中していた。DDSの基本アイデアは、生物活性をもつ物質を全て薬物と考え、これらの物質と生体材料とを組み合わせることで、物質の生物活性を高めることである。つまり、DDSの対象となる薬物は、治療薬だけではなく、予防薬、診断薬、化粧品成分、ヘルスケア物質などを含んでいる。われわれは、このような基本アイデアからDDSを考え、これを実現するための材料、技術、方法論についての研究開発を進めている。例えば、全身あるいは局所粘膜ワクチン薬、および核磁気共鳴イメージング(MRI)、超音波診断薬などに対して、DDS技術を適用すれば、予防ワクチンおよび診断効果は高まる。また、化粧品、ヘルスケア成分へのDDS技術の適用は、それらの生物効果を高めることができる。このように、DDSとは、生物活性をもつ全ての物質に適用でき、自然科学領域において普遍的な技術である。生物作用をもつ物質の徐放化、可溶化、安定化、およびターゲティングなどのDDS技術、方法論についても研究を進め、物質活性の増強を目指している。

#### 4) 外科・内科治療アシストのための生体材料

本研究分野は、高分子、金属、セラミックス、およびそれらの複合材料を医療に応用していくという、本研究所の前身である生体医療工学研究センターの材料科学研究の流れを引いている。その中で、生体内で吸収する性質をもつ高分子材料を中心として、外科・内科治療の補助のための生体材料の研究開発を行っている。

上記の研究内容について、材料科学的な観点から、基礎および応用研究を行っている。得られた研究成果を基に、様々な生体組織、臓器(皮膚、骨、心臓冠動脈、脂肪、軟骨、神経、歯周組織、毛髪、心筋、腎臓など)の再生誘導のメカニズムの解明、その臨床応用、あるいはDDS技術、方法論を用いた薬物治療、予防、診断などについて、医学部、歯学部、獣医学部、企業との共同研究を通じた、応用研究を展開している。加えて、得られた材料や技術の生物医学の基礎研究への応用についても共同研究を通して検討を進めている。

The main objective of our department is to investigate and develop methods, procedures, and technologies



which are applicable to basic and clinical medicines as well as basic researches of biology and medicine from the viewpoint of material sciences. The materials to use in the body and to contact biological substances, like proteins and cells, are defined as biomedical materials and biomaterials. In our department, various types of biodegradable and non-biodegradable biomaterials of polymers, metals, ceramics, and their composites, are being designed and created aiming at their clinical applications as well as the development of experimental tools necessary for basic researches of medicine and biology which scientifically support clinical medicine. We are actively proceeding research and development (R & D) of biomaterials to assist reconstructive surgery and apply to drug delivery systems (DDS) for improved therapeutic efficacy. However, it is often difficult for patients to improve their Quality of Life (QOL) only by the therapeutic procedure of reconstructive surgery because the biomaterials applied are of poor biocompatibility and functional substitutability. For organ transplantation, there are several problems to be resolved, such as the lack of donor tissue and organ or the adverse effects of immunosuppressive agents. The two advanced medical therapies currently available are clinically limited in terms of the therapeutic procedure and potential.

In these circumstances, a new therapeutic trial based on the natural healing potential of patients themselves, has been increasingly expected. This is called as termed the therapy of regenerative medicine. The healing potential is governed by the inherent potentials of cells for proliferation and differentiations. The regeneration and repairing of tissues are naturally induced to therapeutically treat diseases by artificially manipulating the cells potential. The regeneration medicine composed of regeneration therapy and regeneration research which scientifically supports the regeneration therapy of next generation. The objective of generation therapy is to regenerate injured or lost tissues and substitute organ functions by making use of the cell-based natural healing potential. The regeneration therapy is quite different from the reconstructive surgery and organ transplantation from the viewpoint that neither biomaterials and medical devices nor immunosuppressive agents are needed. The basic idea of regeneration therapy is to give cells a local environment which is suitable to promote their proliferation and differentiation, resulting in the cell-based induction of tissue regeneration and repairing. It is tissue engineering that is a biomedical technology or methodology to create this environment for the natural induction of tissue regeneration. Generally, there are three factors necessary to induce tissue regeneration, such as cells, the scaffold for cell proliferation and differentiation, and biosignaling molecules of growth factors and the related gene, which are fundamentally 3 components constituting the body tissue. For successful regeneration therapy of tissue, it is indispensable to efficiently combine various biomaterials with the body components. Among biomaterials, biodegradable biomaterials play an important role in this medical applications. Since there are few metals and ceramics with biodegradable nature, polymer materials of biodegradability are generally preferable for this purpose. The combination of polymers with metals or ceramics is effective in preparing material composites of suitable biodegradability. If a biomaterial is degraded to disappear in the body, it is not always necessary to retrieve the material from the body after the function expected is accomplished. In addition, the material should be degraded at the right time profile not to physiologically impair the natural process of tissue regeneration by the material remaining. Biodegradable biomaterials well-designed are indispensable for the research and development (R&D) of medical devices, DDS, and regeneration therapy or regeneration research of cell research and drug discovery.

Our research goal is to design and create biomaterials from polymers and the composites with metals or ce-



ramics which are practically applicable for regeneration therapy, stem cell technology, DDS, and medical therapy of reconstructive surgery and internal medicine. More detailed explanation about every project is described.

### 1) Biomaterials for Regeneration Therapy

It is well recognized that cells are present in the living tissue interacting with the extracellular matrix (ECM) of natural scaffold for their proliferation, differentiation, and morphogenesis. When the body tissue is largely lost, the ECM itself also disappears. In such a case, only by supplying cells to the defect, we cannot always expect the tissue regeneration at the large defect. One of the possible ways to achieve successful tissue regeneration is to provide a temporary scaffold for the proliferation and differentiation of cells to the defect. We are designing and creating 3-dimensional and porous constructs of biodegradability as this temporary cell scaffold which is an artificial ECM. However, if the number of cells and the amount of biosignaling molecules are not large enough to promote the cell activities, only the supply of a scaffold to the tissue defect will not induce the tissue regeneration. As one trials to break through the situation, it practically possible to make use of growth factors for promoted proliferation and differentiation of cells. It is, however, necessary for in vivo use of growth factors to contrive their administration form because of the in vivo short half-life and instability. One possible answer for that is to use the controlled release of growth factor or the related gene at the tissue site to be regenerated over an extended time period by incorporating the factor or gene into an appropriate carrier. This release technology enables the growth factor to efficiently enhance the biological activity, resulting in promoted cell-induced tissue regeneration. We are designing and preparing the biodegradable carrier of growth factors and genes from gelatin and its derivatives. A new therapy to naturally induce tissue and organ regeneration by the controlled release of various biologically active growth factors has been achieved and the therapeutic potentials have been scientifically demonstrated through animal experiments. Among the tissue regeneration trials, clinical experiments of angiogenic and bone regeneration therapies have been started by the controlled release technology of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor (IGF)-1, and platelet-rich plasma (PRP) to demonstrate the good therapeutic efficacy.

Generally, in the chronic fibrotic disease, such as diluted cardiomyopathy, liver cirrhosis, lung fibrosis, and chronic nephritis, the damaged portion of organ is often occupied with the fibrous tissue, which often causes organ dysfunction. It is highly possible that if the fibrosis is enzymatically digested by a proper way, the fibrotic site is naturally regenerated and repaired on the basis of the inherent regenerative potential of the surrounding normal tissue and consequently the organ function is regenerated and recovered. The systems of drug targeting and the local release with polymers of an organ affinity are being designed and prepared to achieve the regeneration therapy for chronic disease based on the natural healing potential of patients. Based on the drug administration therapy which has been clinically used in internal medicine, this is called as physical regenerative therapy of internal medicine. This is a therapeutic approach which is different from the conventional regenerative therapy of surgery where cells, the scaffold, and signal molecules or the combinations are surgically applied to a tissue defect for regeneration induction thereat. The two surgical and physical regeneration therapies are conceptually identical from the viewpoint of the positive use of natural healing potential. In addition, the basic idea of regenerative therapy will be combined with internal medical therapy to open a new therapeutic field in the future. For example, the combination with aneurysm catheter therapy has been tried, and consequently the aneurysm occlusion by the regenerated

tissue-based organization has been succeeded by the bFGF release system. On the other hand, a new cell culture technology is being developed to enhance the cellular expression level of nucleic acid compounds, such as decoy DNA and small interfering RNA (siRNA), with non-viral gene carriers.

## **2) Biomaterials for Stem Cells Technology and Regeneration Research of Cell Biology and Drug discovery**

There are two approaches to realize regeneration medical therapy. One is the tissue engineering-based therapeutic approach described above. The other is the transplantation therapy of cells which have a potential to induce tissue regeneration. For the latter approach, it is of prime importance to efficiently obtain and prepare cells with a high potential of proliferation and differentiation, such as stem cells, precursors, and blastic cells. In this department, the technology and methodology of cell culture with various biomaterials and bioreactors have been explored to efficiently isolate, proliferate, and differentiate stem cells, precursors, and blastic cells. A series of this study not only aims at the preparation of cells suitable for the therapy of regenerative medicine, but also research and development (R&D) of materials, technologies, and methodologies for basic medicine and biology. They are also applicable for the research of drugs discovery to evaluate their metabolism and toxicity. In addition, non-viral vectors for plasmid DNA and siRNA have been investigated to design the DDS system for gene transfection which can biologically analyze the functions of stem cells and genetically engineer cells to activate the biological functions for cell therapy. For example, a new system for the controlled release of plasmid DNA inside cells has been developed to succeed in enhancing the level of gene transfection and the consequent gene expression as high as or higher than that of viral vector system. In addition, a new technology of cell culturing on plasmid DNA-coated substrates has been designed and enhanced the level of gene expression as well as prolonged the expressed period. This reverse transfection system (SubFection : substrate-mediated transfection) was effective in the gene transfection for stem and matured cells which have not been readily transfected by the conventional method. This can be applied for the cell internalization of low-molecular weight compounds, peptides, proteins, and nucleic acids (siRNA and decoy DNA). We cannot only enhance the biological activities of plasmid DNA and siRNA with the non-viral vectors for stem cells, but also modify their biological functions and differentiation fate.

The minimum unit of body is cell, but that of biological function is the cell aggregate. The cell culture with cell aggregates has been noted for the basic biological and medical research of cells and drug discovery (the drug development and the toxicity evaluation). However when the size of cell aggregates becomes larger, the cells in the aggregates tend to die because of the lack of nutrients and oxygen. This cell death often courses the discontinuation of cell researches. To break through the problem, biodegradable hydrogel microspheres were tried to incorporate into the cell aggregate. The microspheres incorporation enabled cells to improve their function even in the cell aggregate. This technology is one of the key methods to generate the cell-based tissue-like structure in vitro.

## **3) Biomaterials for DDS**

Generally there are few drugs which have a specific selectivity for the site of action. Therefore, the high-dose administration of drugs is necessary to achieve their in vivo therapeutic efficacy, while this often causes the adverse effects of drugs. DDS is a biomaterial-technology which allows a drug to act at the right time the right site of action at the necessary concentration. The objective of DDS includes the controlled release of drug, the prolonga-

tion of drug life-time, the acceleration of drug permeation and absorption, and the drug targeting. Various biomaterials are inevitably required to achieve every DDS objective. In this department, various research projects of DDS for drug and gene therapies have been being carried out from the viewpoint of polymer material sciences. Our definition of “drug” is not limited only to therapeutic substances, but the drug includes every substance which has a certain biological activity and function, such as diagnostic and preventive drugs, cosmetics, and health care substances etc. The DDS technology and methodology can be also applied for preventive and diagnostic substances to enhance the *in vivo* efficacy of vaccination and diagnosis, such as magnetic resonance imaging (MRI), ultrasound diagnosis or molecular imaging. We are developing DDS technology and methodology which are applicable to the research and development of cosmetics and health care sciences. The basic idea of DDS is to efficiently enhance the biological functions of a certain substance by the combination with biomaterials. DDS is defined as an universal technology or methodology which can apply to every research field of natural sciences.

#### 4) Biomaterials for Surgical and Physical Therapies

This department is partly originated from the division of Molecular Design and Biomaterials of the former Research Center for Biomedical Engineering where the medical applications of polymer materials have been investigated extensively. Among the research activities, we continue to molecularly design and create biomaterials mainly from biodegradable polymers aiming at the development of assistant materials in surgical and physical therapies.

From the viewpoint of biomaterial sciences, we are actively proceeding comprehensive biological and medical researches on the scaffold for the cell proliferation and differentiation, the DDS of growth factors and the related genes, and the material-based technology or methodology to use stem, precursor, and blast cells or in addition, their medical applications. Through several R&D collaborations with medical, dental, and veterinary schools as well as private companies, we are planning to apply our basic research results to realize the regeneration induction therapy of various tissues and organs, such as the skin, fat, bone, cartilage, nerve, hair, blood vessels, periodontium, myocardium, and kidney. DDS technologies are also being investigated for their applications of therapeutic, prophylactic, and diagnostic medicines. Some biomaterials are necessary and applicable to further develop the basic researches of cell medicine and biology.

### 【業績目録】

#### ◆ 誌上発表 ◆

##### 1) 原著論文

Kohara, H., Watanabe, K., Shintou, T., Nomoto, T., Okano, M., Shirai, T., Miyazaki, T., Tabata, Y.: The use of fluorescent indoline dyes for side population analysis. *Biomaterials*. **34**(4): 1024-32(2013)

Tanaka, H., Yamaguchi, S., Jo, J., Aoki, I., Tabata, Y., and Takahashi, T.: Synthesis of a Dextran-Based Bone Tracer for *in vivo* Magnetic Resonance and Optical Imagings by Two Orthogonal Coupling Reactions. *RSC Advances*, in press.

Jo, J., Lin, X., Nakahara, T., Aoki, I., Saga, T., Tabata, Y.: Preparation of polymer-based magnetic resonance imaging

- contrast agent to visualize therapeutic angiogenesis. *Tissue Eng Part A*. **19**(1-2): 30-39(2013)
- Somamoto, S., Tabata, Y.: Effect of ProNectin F derivatives on cell attachment and proliferation. *Acta Biomater.* **9**(2): 5194-200(2013)
- Hayashi, T., Wakao, S., Kitada, M., Ose, T., Watabe, H., Kuroda, Y., Mitsunaga, K., Matsuse, D., Shigemoto, T., Ito, A., Ikeda, H., Fukuyama, H., Onoe, H., Tabata, Y., Dezawa, M.: Autologous mesenchymal stem cell-derived dopaminergic neurons function in parkinsonian macaques. *J Clin Invest.* **123**(1): 272-84(2013)
- Negoro, H., Kanematsu, A., Matsuo, M., Okamura, H., Tabata, Y., Ogawa, O.: Development of diurnal micturition pattern in mice after weaning. *J Urol.* **189**(2): 740-46(2013)
- Sasaki, N., Nishii, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y.: Effect of gelatin hydrogel sheet containing Basic Fibroblast Growth Factor on proximal sesamoid bone transverse fracture healing in the horse. *J Equine Vet Sci.* **33**(2): 120-26(2013)
- Kitagawa, F., Takei, S., Imaizumi, T., Tabata, Y.: Chondrogenic differentiation of immortalized human mesenchymal stem cells on zirconia microwell substrata. *Tissue Eng Part C Methods.* **19**(6): 438-48(2013)
- Ishimoto, T., Nakano, T., Umakoshi, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using rBMP-2. *J Bone Miner Res.* **28**(5): 1170-79(2013)
- Iwasaki, Y., Katayama, K., Yoshida, M., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Comparative physicochemical properties and cytotoxicity of polyphosphoester ionomers with bisphosphonates. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition.* **24**(7): 882-95(2013)
- Peng, L.H., Mao, Z.Y., Qi, X.T., Chen, X., Li, N., Tabata, Y., Gao, J.Q.: Transplantation of bone marrow and skin derived stem cells contribute to wound healing with different regenerative features. *Cell Tissue Research.* **352**(3): 573-83(2013)
- Chen, Y.Z., Ruan, G.X., Yao, X.L., Li, L.M., Hu, Y., Tabata, Y., Gao, J.Q.: Co-transfection gene delivery of dendritic cells induced effective lymph node targeting and anti-tumor vaccination. *Pharm Rex.* **30**(6): 1502-12(2013)
- Sekiguchi, H., Ii, M., Jujo, K., Thorne, T., Ito, A., Klyachko, E., Hamada, H., Kessler, J.A., Tabata, Y., Kawana, M., Asahi, M., Hagiwara, N., Losordo, D.W.: Estradiol promotes neural stem cell differentiation into endothelial lineage and angiogenesis in injured peripheral nerve. *Angiogenesis.* **16**(1): 45-58(2012)
- Negoro, H., Okinami, T., Kanematsu, A., Imamura, M., Tabata, Y., Ogawa, O.: Role of Rev-erb $\alpha$  domains for transactivation of the connexin43 promoter with Sp1. *FEBS Lett.* **587**(1): 98-103(2013)
- Hussain, A., Takahashi, K., Sonobe, J., Tabata, Y., Bessho, K.: Bone regeneration of rat calvarial defect by magnesium calcium phosphate gelatin scaffolds with or without bone morphogenetic protein-2. *J Maxillofac Oral Surg.* in press
- Ishimaru, T., Komura, M., Komura, H., Otani, Y., Komuro, H., Sugiyama, M., Terawaki, K., Suzuki, K., Tabata, Y., Iwanaka, T.: Slow release of basic fibroblast growth factor(b-FGF) promotes growth of tracheal cartilage. *J Pediatr Surg.* **48**(2): 288-92(2013)
- Kim, K., Lam, J., Lu, S., Spicer, P.P., Lueckgen, A., Tabata, Y., Wong, M.E., Jansen, J.A., Mikos, A.G., Kasper, F.K.: Osteochondral tissue regeneration using a bilayered composite hydrogel with modulating dual growth factor release kinetics in a rabbit model. *J Control Release.* **168**(2): 166-78(2013)

- Nitta, N., Ohta, S., Sonoda, A., Watanabe, S., Otani, H., Tomozawa, Y., Nitta-Seko, A., Tsuchiya, K., Mukaisho, K., Takahashi, M., Murata, K., Tabata, Y.: Evaluation of the embolic effect and degradability of gelatin microspheres and gelpart particles. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* **2**: 157-64 (2013)
- Kawabata, S., Asano, K., Miyazawa, A., Satoh, T., Tabata, Y.: Electrodeposition of pronectin for titanium to augment gingival epithelium adhesion. *J Tissue Eng Regen Med.* **7**(5): 348-52 (2011)
- 田畑泰彦：組織・臓器を作るバイオマテリアル技術－組織工学と再生医療．日本医師会雑誌．**142**(4): 747-750 (2013)
- 内山裕貴，都築直，徐鍾筆，山田一孝，羽田真悟，眞鍋弘行，田畑泰彦，佐々木直樹：乳牛の蹄底潰瘍に対する多血小板血漿含浸ゼラチンマイクロスフィアの効果．日本獣医師会雑誌．**66**(5): 305-09 (2013)
- Zhang, T.Y., Huang, B., Yuan, Z.Y., Hu, Y.L., Tabata, Y., Gao, J.Q.: Gene recombinant bone marrow mesenchymal stem cells as a tumor-targeted suicide gene delivery vehicle for pulmonary metastasis therapy using non-viral transfection. *Nanomedicine.* in press
- Hu, Y.L., Miao, P.H., Huang, B., Zhang, T.Y., Hu, Z.J., Tabata, Y., Gao, J.Q.: Reversal of tumor growth by gene modification of mesenchymal stem cells using spermine-pullulan/DNA nanoparticles. *J Biomed Nanotech.* in press
- 田畑泰彦：再生医療になくてはならない 細胞を元気にする材料開発．現代化学 6月号．**507**: 28-33 (2013)
- Yamamoto, M., Tabata, Y.: Protein immobilization onto biomaterial surfaces to control cell behaviors for tissue regeneration. *International Journal of Tissue Regeneration.* **4**(2): 36-40 (2013)
- Ishimoto, T., Nakano, T., Umakoshi, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Degree of biological apatite c-Axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using rBMP-2. *Journal of bone and mineral research.* **28**(5): 1170-79 (2013)
- Oka, S., Matsumoto, T., Kubo, S., Matsushita, T., Sasaki, H., Nishizawa, Y., Matsuzaki, T., Saito, T., Nishida, K., Tabata, Y., Kurosawa, M., Kuroda, R.: Local administration of low dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for tendon-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Eng Part A.* **19**(9-10): 1233-43 (2013)
- Yamamoto, M., Tabata, Y.: Protein immobilization onto biomaterial surfaces to control cell behaviors for tissue regeneration. *International Journal of Tissue Regeneration.* **4**(2): 36-40 (2013)
- Kinard, L.A., Chu, C.Y., Tabata, Y., Kasper, F.K., Mikos, A.G.: Bone morphogenetic protein-2 release from composite hydrogels of oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) and gelatin. *Pharm Res.* **30**(9): 2332-43 (2013)
- Miura, N., Shimizu, M., Shinoda, W., Tsuno, S., Sato, R., Wang, Z.Z., Wang, X., Jo, J., Tabata, Y., Hasegawa, J.: Human RGM249-derived small RNAs potentially regulate tumor malignancy. *Nucleic Acid Ther.* **23**(5): 332-43 (2013)
- Seo, J.P., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N.: Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci.* **95**(2): (2013)
- Omata, K., Matsuno, T., Asano, K., Hashimoto, Y., Tabata, Y., Satoh, T.: Enhanced bone regeneration by gelatin- $\beta$ -tricalcium phosphate composites enabling controlled release of bFGF. *J Tissue Eng Regen Med.* in press
- Kawago, M., Yoshimasu, T., Tabata, Y., Yamamoto, M., Hirai, Y., Kinoshita, T., Okamura, Y.: Intrapleural administration of gelatin-embedded, sustained-release basic fibroblast growth factor for the regeneration of emphy-



- semataous lungs in rats. J Thorac Cardiovasc Surg. in press
- Nakamura, Y., Ishikawa, H., Kawai, K., Tabata, Y.: Enhanced wound healing by topical administration of mesenchymal stem cells transfected with stromal cell-derived factor-1. *Biomaterials*. **34**(37): 9393-400(2013)
- Tajima, S., Tabata, Y.: Preparation and functional evaluation of cell aggregates incorporating gelatin microspheres with different degradabilities. *J Tissue Eng Regen Med*. **7**(10): 801-11(2013)
- Lam, J., Kim, K., Lu, S., Tabata, Y., Scott, D., Mikos, A., Kasper, F.: A factorial analysis of the combined effects of hydrogel fabrication parameters on the in vitro swelling and degradation of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research : Part A*. in press
- Lam, J., Lu, S., Meretoja, V.V., Tabata, Y., Mikos, A.G., Kasper, F.K.: Generation of osteochondral tissue constructs with chondrogenically and osteogenically pre-differentiated mesenchymal stem cells encapsulated in bilayered hydrogels. *Acta Biomater*. in press
- Mamun, A., Khan, M., Alles, N., Matsui, M., Tabata, Y., Ohya, K., Aoki, K.: Gelatin hydrogel carrier with the W9-peptide elicits synergistic effects on BMP-2-induced bone regeneration. *J Oral Biosciences* **55**: 217-223(2013)
- Komura, M., Komura, H., Otani, Y., Kanamori, Y., Iwanaka, T., Hoshi, K., Tsuyoshi, T., Tabata, Y.: The junction between hyaline cartilage and engineered cartilage in rabbits. *Laryngoscope*. **123**(6): 1547-51(2013)
- Wang, Y., Orbay, H., Huang, C.Y., Tobita, M., Hyakusoku, H., Miyamoto, M., Tabata, Y., Mizuno, H.: Preclinical efficacy of slow-release bFGF in ischemia-reperfusion injury in a dorsal island skin flap model. *J Reconstr Microsurg*. **29**(5): 341-346(2013)
- Matsumoto, S., Tanaka, R., Okada, K., Arita, K., Hyakusoku, H., Miyamoto, M., Tabata, Y., Mizuno, H.: The effect of control-released basic fibroblast growth factor in wound healing; Histological analyses and clinical application. *Plast Reconstr Surg Global Open*. **1**(6): 44(2013)
- Ohno, K., Mori, C., Akashi, T., Yoshida, S., Tago, Y., Tsujii, Y., Tabata, Y.: Fabrication of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging from Polymer-Brush-Afforded Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Prepared by Surface-Initiated Living Radical Polymerization. *Biomacromolecules*. **14**(10): 3453-3462(2013)
- Tazaki, J., Murata, M., Akazawa, T., Yamamoto, M., Ito, K., Hino, J., Minamida, Y., Nagayasu, H., Arisue, M., Shibata, T., Tabata, Y.: Characteristics of surface behavior and osteoinductivity of biomimetic ceramic scaffold. *Key Engineering Materials*. **529-530**, 50-54(2013)
- Tsuzuki, N., Seo, J., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N.: The effect of bone morphogenetic protein-2, platelet-rich-plasma incorporated gelatin hydrogel microsphere, mesenchymal stem cell and gelatin  $\beta$ -tricalcium phosphate sponge on equine articular cartilage defect. *Canadian Veterinary Journal*. in press
- Seo, J., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, J.H., Tabata, Y., Sasaki, N.: Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Research in Veterinary Science*. in press
- Tsuzuki, N., Seo, J., Haneda, J., Yamada, K., Tabata, Y., Sasaki, N.: Use of a bioengineered osteochondral precursor for treatment of osteochondritis dissecans in a Thoroughbred filly. *Australian Veterinary Journal*. in press
- Seo, J., Tanabe, T., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N.: Effects of bilayer gelatin/ $\beta$ -tricalcium phosphate sponges loaded with mesenchymal stem cells, chondrocytes, bone morphogenetic protein-2, and platelet rich plasma on osteochondral defects of the talus in horses. *Research in Veterinary*

Science. In press

Seo, J., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N.: Osteoinductivity of gelatin/ $\beta$ -tricalcium phosphate sponges loaded with different concentrations of mesenchymal stem cells and bone morphogenetic protein-2 in an equine bone defect model. Veterinary Research Communications. In press

Yamamoto, M., Ikada, Y., Tabata, Y.: Ultrastructure of bone tissue ectopically regenerated by biodegradable hydrogels incorporating bone morphogenetic protein-2. Inflammation and Regeneration. In press(2013).

Kawago, M., Yoshimasu, T., Tabata, Y., Yamamoto, M., Hirai, Y., Kinoshita, T., Okamura, Y.: Intrapleural administration of gelatin-embedded, sustained-release basic fibroblast growth factor for the regeneration of emphysematous lungs in rats. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. In press(2013).

稲生佳菜子, 山本雅哉, 田畑泰彦: 糖応答分解性ハイドロゲル粒子を用いた細胞凝集体の調製. 日本化学繊維研究所 講演集. 70: a16/1-a16/5(2013).

## 2) 著 書

松井 誠, 田畑泰彦: 骨欠損に対する多血小板血漿を用いた再生治療法の開発「整形・災害外科, 4月臨時増刊号」(戸口田淳也企画, 金原出版株式会社, 東京)56(5)635-642(2013)

戸田裕之, 田畑泰彦: 第3章 再生医療における足場材料. 「再生医療・細胞培養の開発と市場」(株式会社シーエムシー出版, 東京)24-45(2013)

田畑泰彦: 第4章 バイオ・生物製剤への応用に向けた DDS 技術の動向と実用化の可能性. 第1節 製剤毎の DDS 研究の動向(5)再生医療における DDS 開発. 「DDS 製剤の開発・評価と実用化手法」(技術情報協会, 東京)223-230(2013)

田畑泰彦: 天然高分子(タンパク質). 「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(メディカルドゥ, 大阪)45-51(2013)

城潤一郎, 田畑泰彦: 天然高分子(多糖). 「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(田畑泰彦編, メディカルドゥ, 大阪)52-57(2013)

齊藤高志, 田畑泰彦: ハイドロゲル. 「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(メディカルドゥ, 大阪)96-101(2013)

木村 祐, 田畑泰彦: 脂肪組織. 「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(メディカルドゥ, 大阪)148-152(2013)

平井健次郎, 田畑泰彦, 坂井義治: 徐放化 bFGF による腸管吻合部創傷治癒促進. 「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(メディカルドゥ, 大阪)221-225(2013)

川上 理, 波多野武人, 山田圭介, 宮本 享, 田畑泰彦: 脳動脈瘤血管内治療. 「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(メディカルドゥ, 大阪)246-250(2013)

城潤一郎, 田畑泰彦: 細胞-drug ハイブリッド. 「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(田畑泰彦編, メディカルドゥ, 大阪)258-263(2013)

松井 誠, 田畑泰彦: 生理活性物質 Dual release. 「ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線, 古くて新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)遺伝子医学 MOOK 別冊」(田畑泰彦編集, 株式会社メディカルドゥ, 大阪)264-269(2013)

田畑泰彦: drug 徐放化による免疫細胞活性化とワクチン効果の増強. 「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるド

- ラッグ徐放技術の最前線」(メディカルドゥ, 大阪)283-288(2013)
- 山本雅哉, 田畑泰彦: .細胞研究(細胞足場, 細胞内徐放, 遺伝子導入).「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がる  
ドラッグ徐放技術の最前線」(田畑泰彦編, メディカルドゥ, 大阪)314-320(2013)
- 上杉佳子, 田畑泰彦: .超音波.「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(田畑泰彦編,  
メディカルドゥ, 大阪)339-344(2013)
- 山本雅哉, 田畑泰彦: .糖.「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(田畑泰彦編, メ  
ディカルドゥ, 大阪)345-350(2013)
- 山本雅哉: DDS 法の利用.「未来型人工関節を目指してーその歴史から将来展望までー」(吉川秀樹, 中野貴由,  
松岡厚子, 中島義雄編集, 日本医学館, 東京)294-298(2013).
- 田畑泰彦: 6. 再生医療 6・1 再生医療と化学の役割, 6・2 再生医療に必要なバイオマテリアル技術, 6・3 再生  
治療アプローチ.「化学マスター講座バイオマテリアル」(丸善出版 東京)141-153(2013)
- 田畑泰彦: 7. ドラッグデリバリーシステム(DDS) 7・1 DDS とは, 7・2 DDS の目的, 7・3 DDS に必要となる  
材料, 7・4 DDS の応用例, 7・5 外部刺激を活用した DDS.「化学マスター講座バイオマテリアル」(丸善出  
版, 東京)169-178(2013)
- 田畑泰彦: 8. 細胞工学 8・1 細胞工学の目的, 8・2 細胞増殖因子等を活用した細胞工学, 8・3 細胞足場材料を  
活用した細胞工学, 8・4 細胞培養装置バイオリアクター.「化学マスター講座バイオマテリアル」(丸善出版,  
東京)195-208(2013)
- 田畑泰彦: 2. バイオマテリアル技術を活用した再生医療: 足場と徐放技術の重要性.「再生医療叢書 2 組織工学」  
(朝倉書店, 東京)25-47(2013)
- 田畑泰彦: Ⅲ章. 分子生物学の基盤的手法と泌尿器科領域への応用 8. 再生医学の応用.「ベッドサイド泌尿器科  
学(改訂第4版)」(南江堂, 東京)163-66(2013)
- 田畑泰彦: 第1編人体環境における DDS 医薬の学問的基礎と応用展開 第1章医学・薬学を中心とした学問的基  
礎 第7節ペプチド・タンパク質療法における DDS 4. 細胞増殖因子.「応用が広がる DDSー人体環境から  
農業・家電までー」(エヌ・ティー・エス, 東京)233-244(2013)
- 田畑泰彦: 第IV編新規素材の開発 第1章細胞培養におけるバイオマテリアル足場技術ー化粧品と創薬研究に向け  
てー.「In vitro 毒性・動態評価の最前線」(シーエムシー出版, 東京)88-92(2013)

### 3) 総 説

- 古村 眞, 田畑泰彦: 気管領域の再生医療 日本気管食道科学会. 専門医通信 **47**: 8-13(2013)
- 田畑泰彦: 血管新生療法におけるバイオマテリアル工学. 日本臨床. **71**: 459-63(2013)
- 田畑泰彦: イメージングとは典型的な医薬工学融合研究領域ー材料科学の重要な役割ー. 高分子. **62**(6): 308(2013)
- Yamamoto, M., Rafii, S., Rabbany, S. Y.: Scaffold biomaterials for nano-pathophysiology. Advanced Drug Delivery  
Reviews. In press(2013).
- Yamamoto, M., Tabata Y.: Protein immobilization onto biomaterial surfaces to control cell behaviors for tissue re-  
generation. International Journal of Tissue Regeneration. **4**: 36-40(2013).
- 山本雅哉: 細胞機能を発揮するための表面加工技術. 再生医療. **12**(3): 243-246(2013).
- 山本雅哉, 田畑泰彦: 再生医療における drug delivery system の応用. 整形・災害外科. **56**(5): 477-86(2013).
-

## ◆ 学会等の発表 ◆

## 1) 学会・研究会発表

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Biomaterials for Regenerative Medicine. International Workshop on Biointerface and Biomedical Engineering 2013(2013.3.13. 岡山)

Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Immobilization of ephrinB2 in an orientation-regulated manner on the surface of hydrogels with different elasticities. Society for Biomaterials(2013. 4.10-13. Boston)

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Design of hydrogel-based biomaterials for regenerative medicine. Taipei Med. Univ.-Inst. for Frontier Med. Sci. Kyoto Univ. Joint Conference(2013.5.13. 京都)

山本雅哉：糖刺激応答性ハイドロゲルを組み込んだ細胞足場材料の作製。第6回 NanoBio 若手ネットワークシンポジウム(2013.6.14-15. 富山)

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Functional hydrogels as cell scaffolds for tissue regeneration. Interdisciplinary discussion of Bioengineering in Kyoto(2013.7.5. 京都)

Yamamoto, M., Arimoto, K., Tabata, Y.: Development of sugar-responsive hydrogel rods as a sacrificial template to create vessel-like structures in collagen gels. BMES 2013 Annual Meeting(2013. 9.25-28. Seattle)

Yamamoto, M., Arimoto, K., Tabata, Y.: Fabrication of sugar-responsive hydrogels as a sacrificial template to create vessel-like structures in collagen gels. 3rd TERMIS AP 2013(2013.10.23-26. Wuzhen)

山本雅哉, 渡邊美穂, 堀中順一, Alan W. Flake, 田畑泰彦：胎児外科治療への応用のための生体吸収性ゼラチンハイドロゲルシートの物性評価。第35回日本バイオマテリアル学会大会(2013.11-25-26. 東京)

Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Sandwich culture of mesenchymal stem cells with bio-functional hydrogels as a three-dimensional culture model. The 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery System(2013. 12.16-20. Maui)

Mamun, A., Khan, M., Alles, N., Tamura, Y., Matsui, M., Tabata, Y., Ohya, K., Aoki, K.: Bone Regeneration Using Gelatin Hydrogel as a Novel Scaffold for a RANKL Antagonist Peptide W9. 第12回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)

Matsuzaki, T., Matsushita, T., Tabata, Y., Saito, T., Matsumoto, T., Nagai, K., Kurosaka, M., Kuroda, R.: Intra-articular administration of gelatin hydrogels incorporating rapamycin-micelle reduces development of experimental osteoarthritis in a murine model. Osteoarthritis Research Society International 2013 World Congress on Osteoarthritis (2013.4.18-21. Philadelphia, USA)

Jo, J., Aoki, I., Saga, T., and Tabata, Y.: Visualization of therapeutic angiogenesis by a polymer-based magnetic resonance contrast agent. The International Society for Magnetic Resonance in Medicine 21st Annual Meeting & Exhibition(2013. 4.20-26. Salt Lake City)

古村浩子, 大谷祐之, 古村真, 小室広昭, 田畑泰彦, 岩中督：ゼラチン多孔体による軟骨再生の為の塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)徐放量の検討。第12回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)

清水 梓, 田島聖士, 飛田護邦, 水野博司, 田畑泰彦：徐放化 bFGF および  $\beta$ -TCP 複合体を用いたラット頭蓋骨における骨新生過程の検討。第12回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)

清水 梓, 田島聖士, 飛田護邦, 水野博司, 田畑泰彦：ラット頭蓋骨欠損に対する徐放化 bFGF および  $\beta$ -TCP 複合体を用いた骨新生過程の検討。第3回 DDS 徐放化再生医療研究会(2013.11.23. 東京)

- Komura, M., Komura, H., Otani, Y., Tabata, Y.: Optimal amount of basic fibroblast growth factor with gelatin sponges. 2nd Biotechnology World Congress(2013.2.18-21. Dubai, UAE)
- 古村 眞, 古村浩子, 星 和人, 田畑泰彦, 高戸 毅: 気道再建における肋軟骨移植と再生軟骨プレートの比較検討. 第12回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)
- Komura, M., Komura, H., Konishi, K., Ishimaru, T., Hoshi, K., Takato, T., Tabata, Y., Iwanaka, T.: Promotion of tracheal cartilage growth by intra-tracheal injection of basic fibroblast growth factor (b-FGF). 60th Annual Meeting of British Association of Pediatric Surgeons(2013.7.16-19 Bournemouth, England)
- Komura, M., Komura, H., Konishi, K.: Promotion of tracheal cartilage growth by intra-tracheal administration of basic fibroblast growth factor(b-FGF). Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS)-AM 2013(2013.11.10-13. Atlanta, USA)
- Ohno, K. Tsujii, Y. Tabata, Y.: Physiological properties of polymer brush-afforded nanoparticles prepared by surface-initiated living radical polymerization. 87<sup>th</sup> ACS Colloid and Surface Science Symposium(2013.6.23-26. Riverside, California)
- 堀 桂子, 西村空也, 田島脩平, 小林喜臣, 板倉 剛, 田畑泰彦, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: Gelatin 粒子を併用したヒト iPS 細胞由来巨大 neurosphere の in vitro 解析. 第32回日本運動器・再生医学研究会(2013.9.28. 兵庫)
- 堀 桂子, 西村空也, 田島脩平, 小林喜臣, 板倉 剛, 田畑泰彦, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: Gelatin microsphere を用いたヒト iPS 細胞由来巨大 neurosphere の in vitro 解析. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会(2013.10.17-18. 千葉)
- 堀 桂子, 西村空也, 田島脩平, 小林喜臣, 板倉 剛, 戸山芳昭, 岡野栄之, 田畑泰彦, 中村雅也: 脊髄損傷治療用 scaffold としての Gelatin 粒子の有用性評価(第一報). 第3回 DDS 徐放化再生医療研究会(2013.11.23. 東京)
- 松崎時夫, 松下雄彦, 松本知之, 岡 真也, 長井寛斗, 上藤淳郎, 齊藤高志, 田畑泰彦, 黒田良祐, 黒坂昌弘: マウス変形性関節症モデルにおける徐放化 rapamycin 投与の関節症進行抑制効果. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会(2013.10.17-18. 千葉)
- 山尾 健, 古川洋志, 齊藤 亮, 大澤昌之, 林 利彦, 田畑泰彦, 山本有平: メラノーマ治療成績向上を目指して～ヒアルロン酸修飾インターフェロン  $\beta$  徐放剤の開発 – 第2報 –. 第22回日本形成外科学会基礎学術集会(2013.11.7-8. 新潟)
- 飛田護邦, 石原久子, 大下高志, 田島聖士, 田畑泰彦, 水野博司: 脂肪組織幹細胞と徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子混合移植による創傷治癒及び血管新生効果. 第22回日本形成外科学会基礎学術集会(2013.11.7-8. 新潟)
- 石原久子, 飛田護邦, 大下高志, 田島聖士, 田畑泰彦, 水野博司: 下肢虚血に対する徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子と脂肪組織幹細胞の混合移植による血管新生補強効果. 第22回日本形成外科学会基礎学術集会(2013.11.7-8. 新潟)
- 石原久子, 飛田護邦, 大下高志, 田島聖士, 田畑泰彦, 水野博司: bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルと脂肪組織幹細胞の同時移植による再生血管の成熟化. 第3回 DDS 徐放化再生医療研究会(2013.11.23. 東京)
- 内山裕貴, 徐鐘筆, 都築直, 山田一孝, 羽田真悟, 古岡秀文, 田畑泰彦, 佐々木直樹: ウマの骨髄由来間葉系幹細胞の培養における血小板溶解液とウシ胎児血清の比較. 第26回日本ウマ科学会学術集会(2013.12.2. 東京)
- 徐鐘筆, 都築直, 上林義範, 内山裕貴, 羽田真悟, 山田一孝, 古岡秀文, 田畑泰彦, 佐々木直樹: ウマの骨欠損に



- に対する幹細胞混合骨形成蛋白質-2 含浸ゼラチンβ-リン酸3 カルシウムスポンジの骨再生効果. 第26 回日本ウマ科学会学術集会(2013.12.2. 東京)
- 上林義範, 都築直, 徐鐘筆, 内山裕貴, 羽田真悟, 山田一孝, 古岡秀文, 田畑泰彦, 佐々木直樹: ウマの大腿骨における関節軟骨欠損に対する滑膜フラップの検討. 第26 回日本ウマ科学会学術集会(2013.12.2. 東京)
- 内藤孝二郎, 田畑泰彦: マクロファージの性質に与える培養基材表面の影響. 第12 回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)
- 内藤孝二郎, 田畑泰彦: 異なる表面をもつ高分子材料とマクロファージとの相互作用. 第62 回高分子学会年次大会(2013.5.29-31. 京都)
- 内藤孝二郎, 田畑泰彦: 表面官能基と硬さの異なる基材上でのマクロファージの状態変化. 日本バイオマテリアル学会第8 回関西若手研究発表会(2013.8.31. 吹田)
- 内藤孝二郎, 田畑泰彦: マクロファージの挙動に与える基材表面の影響. 第35 回日本バイオマテリアル学会大会(2013.11.25-26. 東京)
- 達富幹生, 戸田裕之, 田畑泰彦: 炎症の可視化のためのシリカ粒子イメージング剤の作製. 12 回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)
- 達富幹生, 戸田裕之, 田畑泰彦: 炎症の可視化のためのシリカ粒子イメージング剤のデザイン. 第62 回高分子学会年次大会(2013.5.29-31. 京都)
- 達富幹生, 戸田裕之, 田畑泰彦: 炎症の蛍光イメージングを目指した抗体配向固定化シリカ粒子の作製. 第29 回日本 DDS 学会学術集会(2013.7.4-5. 京都)
- 達富幹生, 田畑泰彦: 一酸化窒素を可視化する高分子ミセルの作製. 第8 回日本バイオマテリアル学会関西若手研究発表会(2013.8.31. 大阪)
- 達富幹生, 田畑泰彦: ゼラチン誘導体ミセルを用いた一酸化窒素イメージング剤の作製. 第35 回日本バイオマテリアル学会大会(2013.11.25-26. 東京)
- Yang-hee, K., Makoto, M., Hirohuki, F., Yasuhiko, T.: Effect of macrophages presence on bone regeneration induced by platelet-rich plasma release. 「第12 回再生医療学会抄録」(2013.3.21-23. 横浜)
- Yang-hee, K., Hirohuki, F., Yasuhiko, T.: Enhancement of bone regeneration by dual release of macrophage recruitment agent and platelet-rich plasma. 「第34 回日本炎症・再生医学会」(2013.7.2-3. 京都)
- Yang-hee, K., Yasuhiko, T.: Enhancement of bone regeneration by dual release of macrophage recruitment agent and platelet-rich plasma 「2013 annual meeting of the Asia Pacific Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS)」(2013.10.23-26. Shanghai, China)
- 金 亮希, 田畑泰彦: Controlled release technology of stromal cell-derived factor-1 and macrophage recruitment agent 「第3 回 DDS 徐放化再生医療研究会」(2013.11.23. 東京)
- 金 亮希, 田畑泰彦: Influence of dual release of macrophages recruitment agent and stromal cell derived factor-1 from gelatin hydrogels on wound healing. 「第35 回日本バイオマテリアル学会」(2013.11.25-26. 東京)
- Yang-hee, K., Hiroyuki, F., Yasuhiko, T.: Effect of macrophages recruitment on bone regeneration induced by platelet-rich plasma release 「第44 回骨カルシウム代謝研究会」(2013.11.29. 京都)
- Yang-hee, K., Yasuhiko, T.: Enhancement of wound healing by dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophages recruitment agent from gelatin hydrogels. The 12th US-Japan symposium on Drug Delivery Systems」(2013.12.16-20. Hawaii, USA)

- 戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: 細胞シグナルタンパク質を配向固定化したハイドロゲルによる間葉系幹細胞の培養. 第12回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)
- 戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: 間葉系幹細胞培養のための細胞シグナルタンパク質配向固定化ハイドロゲルの作製. 第62回高分子年次大会(2013.5.29-31. 京都)
- 戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: 細胞シグナルタンパク質配向固定化ハイドロゲルを用いた間葉系幹細胞培養法の検討. 第34回日本炎症・再生医学会(2013.7.2-3. 京都)
- 戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: 細胞シグナルタンパク質配向固定化ハイドロゲルを用いた間葉系幹細胞のサンドイッチ培養. 第42回医用高分子シンポジウム(2013.7.29-30. 東京)
- 戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: 生体機能性ハイドロゲルを用いた間葉系幹細胞のサンドイッチ培養. 第62回高分子討論会(2013.9.11-13. 金沢)
- Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Immobilization of ephrinB2 in an orientation-regulated manner on the surface of poly(acrylamide) hydrogels with different elasticities. 2013 Annual Meeting of the Biomedical Engineering Society(2013.9.25-28. Seattle)
- Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Orientation-regulated Immobilization of EphrinB2 on the Surface of Poly(acrylamide) Hydrogels with Different Elasticities. TERMIS-AP 2013(2013.10.23-26. Shanghai)
- 戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: 新規分化誘導法としての間葉系幹細胞のサンドイッチ培養技術. 第35回日本バイオマテリアル学会大会(2013.11.25-26. 東京)
- 戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: 生理活性因子配向固定化ハイドロゲルを用いた間葉系幹細胞のサンドイッチ培養. 再生医科学研究所若手発表会(2013.12.25. 京都)
- 戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦: 幹細胞培養および組織再生をターゲットとした生理活性因子機能化足場材料の創製. 平成25年度再生医科学研究所学術講演会(2013.12.25. 京都)
- 田島脩平, 田畑泰彦: 生体吸収性ゼラチン粒子を含む上皮-間葉細胞集合体の作製. 第12回日本再生医療学会(2013.3.21-23. 横浜)
- 田島脩平, 田畑泰彦: 生体吸収性ゼラチン粒子を含む上皮-間葉細胞集合体の作製. 第62回高分子学会年次大会(2013.5.29-31. 京都)
- 田島脩平, 田畑泰彦: 生体吸収性ゼラチン粒子を含む上皮-間葉細胞集合体の作製. 第34回日本炎症・再生医学会(2013.7.2-3. 京都)
- 田島脩平, 田畑泰彦: 生体吸収性ゼラチン粒子を含む上皮-間葉細胞集合体の作製. 第8回日本バイオマテリアル学会関西若手研究発表会(2013.8.31. 大阪)
- 松井 誠, 田畑 泰彦: 第13回次世代医工学研究会(2013.6.21-22. 大阪)
- Matsui, M., Yamamoto M., Tabata, Y.: Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-rich plasma components and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels. The 4th Asian Biomaterials Congress(2013.6.26-19. Hong Kong)
- 松井 誠, 斎藤高志, 田畑泰彦: 第34回日本炎症・再生医学会大会(2013.7.2-3. 京都)
- 松井 誠, 山本雅哉, 田畑泰彦: 第29回日本DDS学会大会(2013.7.4-5. 京都)
- 松井 誠, 山本雅哉, 田畑泰彦: 京都大学工学研究科高等研究院生体医工学研究部門京都大学学際融合教育研究推進センター先端医工学研究ユニット 平成25年度研究発表交流会(2013.9.20. 京都)
- Matsui, M., Yamamoto M., Tabata Y.: Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-rich plasma (PRP)

components and basic fibroblast growth factor (bFGF) from gelatin hydrogels. Annual meeting of the Asia Pacific Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS-AP) (2013.9.23-26. Shanghai)

松井 誠, 山本雅哉, 田畑泰彦: 第3回 DDS 徐放化再生医療研究会 (2013.11.22-23. 東京)

松井 誠, 永田純平, 田畑泰彦: 第35回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11.25-26. 東京)

Matsui, M., Yamamoto M., Tabata Y.: Platelet-rich plasma enhances angiogenesis induced by basic fibroblast growth factor from release gelatin hydrogels. The 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems Conference (2013.12.16-20. Hawaii)

永田純平, 松井誠, 田畑泰彦: ラパマイシンの細胞内徐放化を目的とした生体吸収性微粒子の作製. 第59回高分子研究発表会 (2013.7.12. 神戸)

永田純平, 松井誠, 田畑泰彦: 生体吸収性微粒子を用いたラパマイシンの細胞内徐放. 第8回関西若手研究発表会 (2013.8.30. 大阪)

永田純平, 松井誠, 田畑泰彦: ラパマイシンの細胞内徐放化による細胞内オートファジー制御. 第35回バイオマテリアル学会 (2013.11.25-26. 東京)

Dai, N., Soh, S., Yasuhiko, T.: Periodontal tissue regeneration with gelatin hydrogel sponges incorporating PRP. The Japanese Society for Regenerative Medicine (2013.3.22. Yokohama)

Dai, N., Soh, S., Yasuhiko T.: Periodontal tissue regeneration with gelatin hydrogel sponges incorporating PRP. Japanese Society for Biomaterials (2013.11.27. Tokyo)

西本慶喜, 上田真澄, 齋藤高志, 田畑泰彦: 遺伝子導入ベクターとしてのスベルミン導入プルランの作製. 第59回高分子研究発表会 (2013.7.21. 神戸)

西本慶喜, 田畑泰彦: プラスミド DNA 細胞内導入高分子としてのスベルミンプルランの作製. 日本バイオマテリアル学会第8回関西若手研究発表会 (2013.8.31. 大阪)

西本慶喜, 上田真澄, 石川英史, 田畑泰彦: 遺伝子発現期間の制御を目指したゼラチンナノ粒子の作製. 第35回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11.25-26. 東京)

齊藤高志, Juthamas Ratanavaraporn, 田畑泰彦: ゼラチンスポンジを用いた骨髄間葉系幹細胞による骨-軟骨界面組織の作製の試み. 第12回再生医療学会総会 (2013.3.21. 神奈川)

齊藤高志・Juthamas Ratanavaraporn・田畑泰彦: 骨・軟骨界面構築のためのゼラチンスキャホールドのデザイン. 第62回高分子年次大会 (2013.5.29. 京都)

齊藤高志・Juthamas Ratanavaraporn・田畑泰彦: 活性型ビタミン D3 徐放化ゼラチンスポンジを用いた骨髄間葉系幹細胞の骨分化. 第35回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11.25. 東京)

酒井成貴, 佐藤圭祐, 貴志和生, 田畑泰彦: PPAR $\gamma$  アゴニスト徐放化ゼラチンハイドロゲルを用いた創傷治癒促進効果 (2013.11.23. 東京)

## 2) 講演・シンポジウム

Tabata, Y.: Biomaterials - based regenerative medicine. Gadjah Mada University Seminar (2013.1.9-10. Indonesia)

田畑泰彦: 生体機能性高分子 - からだを治すポリマー. 平成24年度 KIPS 高分子講座 2012 (2013.1.16. 京都)

田畑泰彦: バイオマテリアルからみた再生治療の現状と今後の展望, 「第116回日本美容外科学会学術集会」 (2013.1.19. 東京)

- 田畑泰彦：再生医療の現状と展望。岩手医科大学講義(2013.1.23. 盛岡)
- 田畑泰彦：材料技術からみた再生医療－再生治療と再生研究－。日産化学工業株式会社講演(2012.1.24. 白岡)
- 田畑泰彦：ものづくり企業が活躍できる再生医療分野。京都府ウエルネス産業人材育成セミナー(2013.1.25. 京都)
- 田畑泰彦：再生医療を実現するバイオマテリアル技術。nano tech2013「ライフ・ナノテクノロジー～未来を切り開く最先端技術～」(2013.1.30. 東京)(招待講演)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生医療の現状と今後。アスピオファーマ株式会社講演会(2013.2.6. 神戸)
- 田畑泰彦：Regeneration therapy from the viewpoint of biomaterials。第4回日韓産業技術協力フォーラム(2013.2.26. 東京)
- 田畑泰彦：細胞治療のために必要となるバイオマテリアル技術。医工学フォーラム－2012年度特別学術講演会－(2013.2.27. 京都)
- Tabata, Y.: Tissue Engineering for angiogenesis Therapy. Bandon University, Medical School Seminar(2013.3.6-7. Indonesia)
- 田畑泰彦：循環器再生医療の Needs と Seeds とは？。第77回日本循環器学会学術集会(2013.3.15・16. 横浜)
- 田畑泰彦：再生医療をリードする先生方に新しい情報を聞いてみよう。科学・技術フェスタ(2013.3.17. 京都)
- 田畑泰彦：材料技術からみた最先端医療と医学研究。G-COE 講演会(2013.3.27. 京都)
- 田畑泰彦：再生医療の運動器疾患への応用。第57回日本リウマチ学会総会・学術集会(2013.4.20. 京都)
- 田畑泰彦：再生治療の現状と今後－自然治癒力を高めて病気を治す－。長崎障害者支援再生医療学会(2013.4.23. 長崎)(特別講演)
- 田畑泰彦：再生医療の最前線と今後の展望。同志社大学講義(2013.4.26. 京都)
- 田畑泰彦：再生医療ビジネスを研究・治療に分けて考えてみよう。平成25年度 KRP 再生医療ビジネスサポート懇話会(2013.4.26. 京都)
- 田畑泰彦：再生医療のための医工連携の最前線－再生治療と再生研究のためのモノづくり技術－。BIO tech 2013(2013.5.10 東京)(特別講演)
- 田畑泰彦：中小企業と切り拓く再生医療。経済活力・雇用創出研究会(2013.5.28. 東京)
- 田畑泰彦：先端医療・医学研究における材料技術の重要性－医工薬連携を通して－。第1回熊本大学医工連携フォーラム(2013.5.29. 熊本)
- 田畑泰彦：医工学分野・再生医療分野におけるマクロファージの役割について。熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学分野セミナー(2013.5.30. 熊本)
- Tabata, Y.: Biomaterials Technology Necessary for Regeneration Therapy and Research. 10th International Frontiers in Biomedical Polymers Symposium(2013.6.3. Vancouver)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた先端医療。九州歯科大学講義(2013.6.14. 北九州)
- Tabata, Y.: Synergistic effect of dual release of chemokine and growth factor on tissue regeneration. TERMIS-EU(2013.6.17-21 Istanbul)(特別講演)
- 田畑泰彦：循環器領域における再生治療の現状と今後の展望。第11回扇研究会(2013.6.22. 大阪)(特別講演)
- Tabata, Y.: Drug Delivery Technology of Biomaterials Realizes Regeneration Therapy. The 4th Asian Biomaterials Congress(2013.6.26-29. Hong Kong)(招待講演)
- 田畑泰彦：再生治療と再生研究に必要不可欠な生体材料技術。第29回日本 DDS 学会学術集会(2013.7.4. 京都)
- 田畑泰彦：先端治療と医学研究のためのバイオマテリアル技術。長崎腎疾患エキスパートミーティング(2013.7.9.

長崎)(特別講演)

田畑泰彦：ゼラチンの無限の可能性～基礎研究ツールから医療・化粧品応用まで～. 新田ゼラチン株式会社講演会 (2013.7.12. 大阪)

田畑泰彦：バイオマテリアル(生体材料)技術からみた再生医療－再生治療と再生研究－. 日本動物細胞工学会福井大会(2013.7.19 福井)(特別講演)

Tabata, Y.: Modification of macrophage function through pioglitazone release with biodegradable hydrogels. 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Society (2013.7.22. Hawaii)

田畑泰彦：バイオマテリアル分野からみた最先端医療技術. 第2回国際先端生物学・医学・工学会議 ICBME 2013 (2013.7.28 名古屋)(基調講演)

田畑泰彦：自然治癒力を高めて病気を治す～再生医療の実際～. 平成25年度芦屋川カレッジ(2013.7.31. 芦屋)

田畑泰彦：iPSの概要～再生医療最前線, 新たな医工連携の可能性を求めて～. 京都工業会中小企業技術幹部交流会(2013.8.7. 京都)

田畑泰彦：もの作り技術からみた再生医療－再生治療と再生研究－. 北東北ナノメディカルクラスター研究会 (2013.8.9. 秋田)(基調講演)

Tabata, Y.: Experiences with Drug Delivery Systems for Regenerative Medicine. Advances in Tissue Engineering 2013(2013.8.16. Houston)

田畑泰彦：再生治療の基本概念は自然治癒力の促進. 日本臓器製薬株式会社講演会(2013.8.30. 加東)

田畑泰彦：ものつくりの観点から再生医療を考える. 東京化成工業株式会社講演会(2013.9.5. 東京)

田畑泰彦：バイオマテリアルからみた心血管再生技術. 第4回 Molecular Cardiovascular Conference II (2013.9.7. 北海道)

Tabata, Y.: Controlled Release Technology of Bio-Signal Molecules for Regeneration Therapy. The 25th European Conference on Biomaterials(2013.9.8-13 Madrid)(招待講演)

田畑泰彦：再生治療と再生研究(細胞, 創薬)を実現させるモノづくり技術. 専門家との直接意見交換シンポジウム in KRP Part VI (2013.9.18. 京都)

田畑泰彦：バイオマテリアルを活用した再生治療と再生医学. 運動器移植・再生医学研究会(2013.9.28. 神戸)(特別講演)

田畑泰彦：バイオマテリアル技術を活用した再生治療と再生研究. Tokyo Cardiac Seminar2013(2013.10.1. 東京)(特別講演会)

田畑泰彦：モノづくり技術からみた再生治療と再生研究. 京都リサーチパーク平成25年度「解説講座」(2013.10.2. 京都)

Tabata, Y.: Tissue Engineering Technology Indispensable for Translational Regenerative Medicine. The International Conference Mime-Materials in Medicine (2013.10.8-11. Faenza)

Tabata, Y.: Growth factor specifications. World Summit on Regenerative Medicine 2013(2013.10.19-21. X'ian)

Tabata, Y.: Tissue Engineering of Growth Factor Indispensable for Regenerative Medicine. TERMIS-AP Meeting 2013(2013.10.23-25. Wuzhen)

田畑泰彦：バイオマテリアルを用いた再生医療. 大阪大学歯学研究科特別講義(2013.10.30. 吹田)

田畑泰彦：先端医療と細胞研究を支えるバイオマテリアル技術. 京都大学大学院生命科学研究科リトリート (2013.10.31. 大津)(特別講座)



- 田畑泰彦：DDS が拓く再生治療と再生研究の世界。第 3 回 DDS 製剤臨床応用 FG 合宿討論会(2013.11.1-2. 神奈川県足柄下郡)(招待講演)
- 田畑泰彦：医療機器と再生医療。京都府立医科大学眼科講義(2013.11.6. 京都)
- 田畑泰彦：バイオマテリアル技術を利用した再生医療。耳鼻咽喉科の研究会(2013.11.10. 郡山)(特別講演)
- 田畑泰彦：糖応答分解性ハイドロゲル粒子を含む細胞凝集体の調製。第 71 回日本化学繊維研究所講演会(2013.11.12. 京都)
- 田畑泰彦：患者まで届いている再生医療の現状と今後。第 21 回四国 MMC 研究会(2013.11.16. 高松)(特別講演)
- 田畑泰彦：Signal 因子とドラッグデリバリー。日本歯科大学講義(2013.11.19. 東京)
- 田畑泰彦：自然治癒力を活用した最先端医療－再生医療の現状と将来展望。第 7 回日本薬局学会学術総会(2013.11.24. 大阪)
- 田畑泰彦：再生医療ビジネスに不可欠なもの作り技術。京都産学公連携フォーラム 2013(2013.11.25. 京都)
- Tabata, Y.: Drug Delivery Technology for Tissue Regeneration Therapy. The 15th International Conference on Biomedical Engineering(2013.12.4-6. Singapore)
- 田畑泰彦：Biomaterials Indispensable for Advanced Medical Therapy. 神戸大学大学院医学研究科特別講義(2013.12.12. 神戸)
- 田畑泰彦：ナノバイオテクノロジーを活用した再生医療－再生治療と再生研究－。第 16 回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ (2013.12.26. 東京)
- 山本雅哉, 田畑泰彦：バイオマテリアルを用いた血管再生の Tissue Engineering, 第 12 回日本再生医療学会総会(シンポジウム)(2013.3.21-23. 横浜)
- Yamamoto, M., Tabata, Y.: Design of hydrogel-based biomaterials for regenerative medicine. 日本化学会第 93 春季年会 アジア国際シンポジウム(招待講演)(2013.3.24. 草津)
- 山本雅哉, 田畑泰彦：再生医療におけるバイオマテリアル・DDS 技術の役割。第 51 回 NIH 金曜会セミナー(招待講演)(2013.4.17. Bethesda)
- 山本雅哉, 田畑泰彦：機能性ハイドロゲルを用いた再生医療。電気学会「ナノメディシンに向けた光・量子ビーム応用技術調査専門委員会」(招待講演)(2013.5.20. 京都)
- 山本雅哉, 田畑泰彦：基礎生物医学研究のためのハイドロゲルバイオマテリアルの開発。新学術領域研究「がん微小環境」公開ワークショップ(2013.6.20-21. 東京)
- Yamamoto, M., Tabata, Y.: Functional hydrogels as cell scaffolds for tissue regeneration. 第 8 回研究所ネットワーク国際シンポジウム(2013.6.27-28. 京都)
- 山本雅哉, 田畑泰彦：機能性ハイドロゲルを用いた 3 次元組織構築。幹細胞産業応用促進イニシアティブ(SSCI)ワークショップ(2013.8.20. 東京)
- Yamamoto, M., Tabata, Y.: Vascular tissue engineering using functional hydrogel biomaterials. Biomedical Engineering Seminar, UCLA(2013.9.23. Los Angeles)
- Yamamoto, M.: Functional hydrogels for regenerative medicine. The Professor Anseth Laboratory Seminar at BioFrontiers Institute, University of Colorado Boulder(招待講演)(2013.10.1. Boulder)
- 山本雅哉：機能性ハイドロゲルを用いた再生医療の試み。九州大学先端物質化学研究所木戸秋研究室セミナー(招待講演)(2013.10.8. 福岡)
- 山本雅哉：ハイドロゲルを利用した細胞周辺環境の構築。京都リサーチパーク 平成 25 年度 再生医療の全体像

を見わたせる分かりやすい解説講座(招待講演)(2013.11.11. 京都)

Yamamoto, M.: Design of hydrogel biomaterials for tissue regeneration. KIPS-ESPCI Workshop on Polymer Science 2013(招待講演)(2013.11.28-29. Paris)

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Functional hydrogels to create cell microenvironments in vitro. The Max Bergmann Center of Biomaterials Dresden seminar(招待講演)(2013.12.2. Dresden)

## 組織修復材料学分野 Department of Reporative Materials

分野主任 教授 岩田 博夫

Prof. Hiroo Iwata

### 【研究概要】

当研究分野では、病気や怪我の治療に役立つ人工材料を創り出すための研究を行っています。それらの材料は人体の中で機能したり、体外での細胞操作・分析に効力を発揮するなど、その目的と機能は様々です。当研究分野ではおもに、高分子を中心とする有機材料や、細胞や生体分子を制御・分析するための様々な技術を駆使することによって、それらの研究を進めています。このような研究を通じて、再生医療や低侵襲手術のような高度先進医療に貢献したいと考えています。

#### 材料-生体システム間相互作用の解析

体内に人工材料を埋込むと異物を排除しようと様々な生体反応が起こります。人工血管や人工心臓などを体内で長期間機能させるには、これらの生体反応を深く理解しコントロールする必要があります。当研究室では、様々な分析手法を用いて人工材料表面で生体反応が起こる仕組みを調べています。また、病気の判定基準となる血液中のバイオマーカーを高感度で検出できる装置を開発し、患者のそばですぐに結果を出せる検査システムの確立を目指しています(図1)。

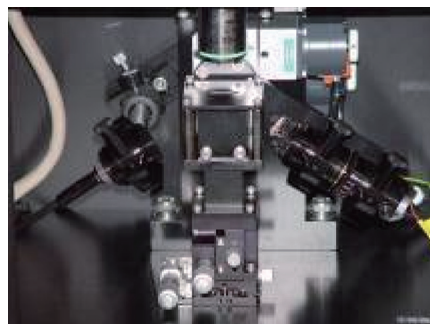


図1. 血液中のバイオマーカーを迅速・高感度計測するための装置。

#### 細胞表面修飾とその応用

細胞移植による臓臓や中枢神経の再生医療に大きな期待が寄せられています。しかし、移植された細胞の機能を高く維持するには、細胞がレシピエントの生体防御機構からの攻撃に打ち勝たなければなりません。これには両親媒性高分子からなる薄膜によって細胞を被覆する方法が有効であることを示してきました(図2)。また、細胞の表面修飾技術を応用すれば、細胞間の接着を引き起こすことが可能です。この技術を利用することで、ES細胞やiPS細胞の分化誘導について調べることができ、再生医療への新しい知見を得ることが期待できます。

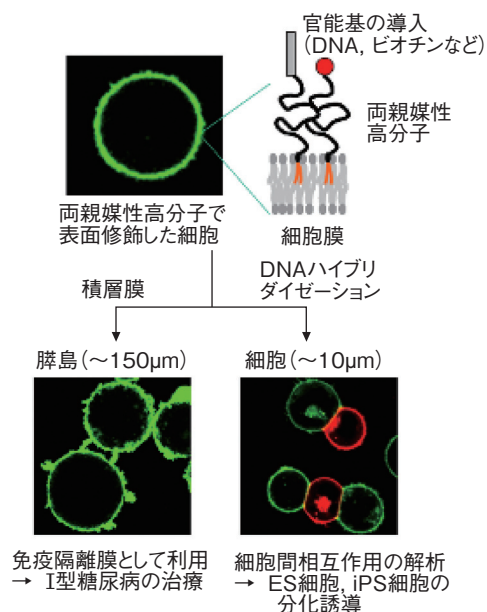


図2. 両親媒性高分子薄膜による細胞の被覆。

#### ES細胞/iPS細胞の凍結保存技術の確立

ES細胞やiPS細胞を利用した再生医療を確立するには、安定した細胞供給が必要になります。当研究分野では、細胞の生存率

を高く維持しながら凍結保存することに成功し、その技術の実用化に向けて研究を進めています。

### 血管内手術用具の開発

患者への負担の大きい外科的治療に対して、カテーテルを血管内に挿入して動脈瘤などを治療する方法(血管内治療)が注目されています。動脈瘤に詰め物をしてしまうコイル塞栓術と血管の正しい流れを確保するカバードステント留置術の二つの方法で(図3)、多様な形状をもつ動脈瘤の破裂を未然に防ぐデバイスを開発しています。これには、血液や血管表面と材料との相互作用や、材料の力学的・化学的性質を考慮したデバイス設計が求められます。

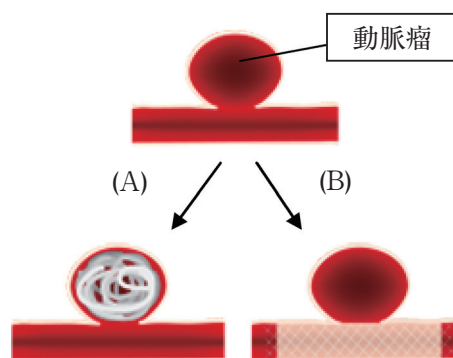
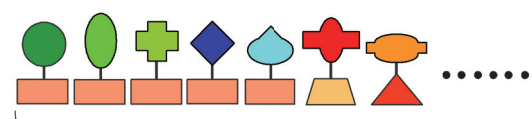


図3. (A)コイル塞栓術および(B)カバードステント留置術の模式図。

### 中枢神経の再生医療に向けた機能材料の設計

中枢神経疾患の一つであるパーキンソン病を、細胞移植によって治療する試みがなされています。しかし、そのような治療法を普及させるには、移植細胞源となる神経幹細胞の大量確保や、移植細胞の生着率向上を可能にする技術が確立されなくてはなりません。当研究分野では、大量の移植細胞を効率よく調製するための細胞培養デバイスの設計を行うとともに、移植細胞を保護するための蛋白質性材料の開発に取り組んでいます。これらの機能材料の構成要素には、合理的にデザインされた人工蛋白質が有用です(図4)。

細胞制御能と基材結合能をもつ種々のキメラ蛋白質を設計



目的とする機能に応じて適切なキメラ蛋白質を基材と複合化

細胞培養用デバイス  
(ガラス・合成高分子ベース)



移植細胞保護材料  
(生体高分子ベース)



図4. キメラ蛋白質を構成要素とするデバイスおよび機能材料の設計。

### 細胞チップ分析技術の確立

多種類の生体分子の機能を迅速に分析するための細胞チップの開発を行っています。アルカンチオール自己組織化単分子膜のマイクロパターンをもつ基板材料を利用して多種類のDNA, RNA, 蛋白質など配列固定し、それらを同時に細胞に作用させることで、固定された分子の生物学的機能を並列分析することが可能です(図5)。細胞チップ分析法は、生物学研究のみならず、再生医療、医薬品開発、臨床検査などの様々な分野に大きなインパクトを与えるものと期待しています。

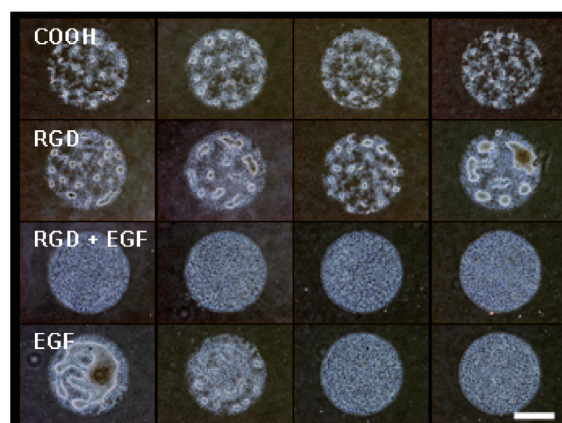


図5. 細胞チップによる蛋白質性材料のハイスループット機能アッセイの一例。

Our research group intends to develop engineered materials that contribute practically and efficiently to the advanced therapeutic interventions for the treatment of diseases and traumatic injuries. These materials are ex-

pected to exhibit diverse functions *in vitro* or *in vivo*. Fundamental and applied studies are undertaken to realize such biomaterials, taking advantage of organic materials, namely polymeric materials and state-of-the-art techniques for analyzing and handling biomolecules and cells.

Research subjects currently undertaken in our department are listed below.

#### **Surface chemistry of biomedical materials**

Protein adsorption, complement activation, cell adhesion are involved in the initial reactions against man-made materials with living bodies. It is necessary to elucidate these mechanisms in relation to the surface properties so as to rationally design biocompatible surfaces of synthetic implants. Most of information on the biological reactions against artificial polymeric materials has been accumulated from studies with polymeric materials. However, polymer surfaces could not be assumed rigid and immobile at equilibrium. The polymer molecules in the vicinity of the surface or interface would exhibit motion and relaxation in response to the different interfacial environments. Thus, it is difficult to prepare model surfaces using polymeric materials for studies of protein adsorption and cell adhesion. Self-assembled monolayers of alkanethiols formed on a gold thin film provide well-defined model surfaces suitable for studies on interfacial phenomena and intermolecular interactions. The surface plasmon resonance technique can be applied to analyze the interfacial phenomena under water. We have been studying protein adsorption, complement activation, and cell adhesion on well-defined surfaces made of self-assembled monolayers using the surface plasmon resonance technique as well other analysis techniques highly sensitive for interfacial molecular events.

#### **Polymeric materials for cell transplantation therapy**

Islets of Langerhans have been transplanted to treat insulin-dependent diabetes patients. Adult pancreatic  $\beta$  cells are known to have a poor growth capacity. Islets containing  $\beta$  cells from cadaver donors or animals should be employed. In bioartificial pancreas, islets are encapsulated into a semi-permeable membrane and then implanted into the diabetic patients to protect them from immune rejection. The semi-permeable membrane permits permeation of oxygen and nutrient which are necessary for islet survival, but prohibits contact of islet cells with components of the host immune system. We encapsulated islets into agarose-based microbeads and induced normalization of blood glucose levels of diabetic recipient mice by implanting 1000 microencapsulated hamster islets into the peritoneal cavity.

Several research groups showed that transplantation of neural stem cells (NSCs) or NSC-derived progenitors to the site of lesions was effective for structural and functional restoration of the central nervous system. However, clinical applications of NSC further require methodological advances especially for controlling the engraftment, proliferation, migration, and differentiation of NSCs. Our approach is to construct composite biomaterials that consist of extracellular matrix (ECM) components and signaling molecules such as growth factors and cell adhesion molecules. We are employing genetic engineering to design rationally such composite biomaterials.

#### **Cell processing technology for regenerative medicine**

Cells and ECMs are important components for regenerative medicine. In recent years, many research groups have devoted enormous efforts to establish *in vitro* culture conditions in which stem cells, such as ES cells and tis



sue-derived stem cells, differentiate into various functional cells. Those cells are expected to be very useful for treatment of various diseases. Many kinds of stromal cells have been used to differentiate stem cells to functional cells. However, most of stromal cells preferentially used are derived from mice. Some authorities who are in charge of regulatory issue have pointed out the difficulty to rule out the possibility that retrovirus incorporated in mouse gene will be activated and transferred to stem cells and functional cells derived from stem cells. One of our research activities is focused on the development of stromal cell free culture systems used for the induction of ES cells to various functional cells. ES cells cultured on the substrate, onto which bioactive molecules isolated from stromal cells, are immobilized effectively differentiated to dopaminergic neurons.

Conventional cell culture substrates are not always suitable for cells used for regenerative medicine. Neurons differentiated from ES cells in vitro are very difficult to be collected from a cell culture flask without deterioration of cell functions, because long axons from neurons are easily damaged during detachment of neural cells from the cell culture substrate. Cell sheets but not single cells are needed in some instance, such as regeneration of a skin and a mucous membrane. We have been examining a film of cellulose derivatives for a cell culture substrate. Cells cultured on it are removed by cellulose-degrading enzyme, cellulase, without damaging cells on the substrate.

#### **Cell chips for high-throughput functional screening**

Transfectional array : Functional characterization of human genes may be one of the most challengeable tasks in the post-genome era. Due to a huge number of novel genes discovered in genomics, high-throughput methods are required to express or silence in parallel thousands of genes in living cells. The objective of our study is to fabricate transfectional arrays through patterning of self-assembled monolayers on a gold substrate and the subsequent site-specific spotting of different expression vectors or short interfering RNAs.

Antibody array : Recent progress in stem cell research provides us with promising options of cell sources for use in tissue engineering. However, insufficient knowledge about specific surface antigens expressed on most of stem cells limits their application in regenerative medicine. To solve this problem, we developed a high-throughput analytical method for typing multiple membrane proteins. Our method is based on solid-phase cytometry using an antibody array prepared on a patterned alkanethiol monolayer.

ECM array : Arrays that display a panel of biologically-active substances on a flat plate are promising due to their potential use in functional screening over multiple samples in a parallel fashion. We developed cell-based arrays that displayed combinatorially various ECM-growth factor composites and used them for parallel and rapid screening biomaterials that serve to maintain NSCs and direct the differentiation of NSCs.

### **【業績目録】**

#### **◆ 誌上発表 ◆**

##### **1) 原著論文**

Kitamura, N., Nakai, R., Kohda, H., Furuta-Okamoto, K., Iwata, H. : Labeling of islet cells with iron oxide nanoparticles through DNA hybridization for highly sensitive detection by MRI. *Bioorg. Med. Chem.* **21**: 7175-7181 (2013)

Konagaya, S., Kato, K., Nakaji-Hirabayashi, T., Iwata, H. : Selective and rapid expansion of human neural progenitor

- cells on substrates with terminally anchored growth factors. *Biomaterials*. **34** : 6008-6014(2013)
- Takemoto, N., Teramura, Y., Iwata, H. : Immobilization of Sertoli cells on islets of Langerhans. *Biomater. Sci.* **1**, 315-321 (2013)
- Takemoto, N., Liu, X., Takii, K., Teramura, Y., Iwata, H. : Transplantation of co-aggregates of Sertoli cells and islet cells into liver without immunosuppression. *Transplantation in press*
- Deno, S., Takemoto, N., Iwata, H. : Introduction of antioxidant-loaded liposomes into endothelial cell surfaces through DNA hybridization. *Bioorg. Med. Chem. in press*
- 岩田博夫, 竹本直紘, 劉喜宝, 滝井健人 : 睪島細胞と免疫抑制効果を持つ細胞との細胞凝集体の移植による糖尿病治療効果. - (I) セルトリ細胞 - 日本化学繊維研究所講演集. **70**, (2013)
- Sakurai, K., Hoffecker, I.T., Iwata, H. : Long term culture of cells patterned on glass via membrane-tethered oligonucleotides. *Biomaterials*, **34**(2), 361-370(2013)
- Ciappino, C., Hoffecker, I.T. : Advancing our understanding of biosurfaces. Conference report for FEBS-ESF conference. *Materials Views*.
- Luan, M. N. ; Iwata, H. : Inhibition of instant blood-mediated inflammatory responses by co-immobilization of sCR1 and heparin on islets. *Biomaterials*. **34**(21), 5019-5024(2013)
- Kodama, T. ; Iwata, H. : Comparison of bare metal and statin-coated coils on rates of intra-aneurysmal tissue organization in a rat model of aneurysm. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **101** (4), 656-662(2013)

## 2) 著 書

- Teramura, Y., Chen, H., Takemoto, N., Sakurai, K., Iwata, H. : Polymeric materials for surface modification of living cells. *Polymeric Biomaterials, Volume II, Medicinal and Pharmaceutical Applications of Polymers : Third Edition* (Dumitriu, S., and Popa, V., Ed. ) *in press*

---

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- Arima, Y., Iwata, H. : Effect of surface functional group on adsorption of cell adhesive proteins and subsequent cell adhesion using self-assembled monolayers. International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013(NMMS2013) (2013.10.8-10. Tokyo)
- 有馬祐介, 岩田博夫 : 人工材料表面への細胞接着に影響を与える種々の因子, 143 回ポータル会(2013.12.7. 京都)
- 北村成史, 中井隆介, 岩田博夫 : 移植後の MR 画像診断を指向したランゲルハンス氏島表面のラベル化技術, 第 12 回再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)
- 北村成史, 岩田博夫 : ランゲルハンス氏島と内皮細胞間の相互作用および凝集体形成挙動, 第 12 回再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)
- 北村成史, 岩田博夫 : 睪島細胞と血管内皮細胞の共凝集塊の形成と塊内の細胞配置, 第 62 回高分子学会年次大会(2013.5.29-31. 京都)
- Nakai, R., Azuma, T., Shigeno, K., Takizawa, O., Iwata, H. : Analysis of the relationship of mandibular movement with the condition of the masseter muscles and the temporomandibular joint using multi-section dynamic

- MRI and DTI and a T1, T2 map. ISMRM 21st Annual Meeting & Exhibition (2013.4.20-26. Salt Lake City)
- Nakai, R., Azuma, T., Kodama, T., Tanemura, H., Hamada, K., Suzuki, H., Taki, W., Iwata, H.: Development of cerebral aneurysm coils with equivalent volume magnetic susceptibility to body tissue that generate small susceptibility artifacts in MRI. ISMRM 21st Annual Meeting & Exhibition (2013.4.20-26. Salt Lake City)
- 中井隆介, 東 高志, 茂野啓示, 瀧澤修, 岩田博夫: 下顎運動の動的撮像データに対する処理手法の開発. 第41回日本磁気共鳴医学会大会 (2013.9.19-21. 徳島)
- Nguyen, M.L., Iwata, H.: Layer-by-layer Co-immobilization of soluble complement receptor 1 and heparin on islets. 第62回高分子学会年次大会 (2013.5.29-31. 京都)
- Nguyen, M.L., Iwata, H.: Prolonged islet allograft survival after transplantation into pre-vascularized subcutaneous site without immunosuppression. 14th World Congress of International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA) (2013.9.24-27. Monterey)
- Egawa, E.Y., Kitamura, N., Nakai, R., Iwata, H.: A DNA hybridization system for labeling and tracking of transplanted neural stem cells by MRI. 第35回 日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11.25-26. 東京)
- 竹本直紘, 岩田博夫: Cell LEGO. 第12回日本再生医療学会総会 (2013.3.21-23. 横浜)
- 竹本直紘, 劉喜宝, 滝井健人, 岩田博夫: セルトリ細胞と膵ランゲルハンス島の複合細胞凝集体による糖尿病治療. 第12回日本再生医療学会総会 (2013.3.21-23. 横浜)
- 竹本直紘, 劉喜宝, 滝井健人, 岩田博夫: 免疫抑制剤を用いない膵島移植法へーセルトリ細胞の利用可能性ー. 第62回高分子学会年次大会 (2013.5.29-31. 京都)
- Takemoto, N., Liu, X., Takii, K., Iwata, H.: Co-aggregates of Sertoli cells and islet cells allow long-term graft survival in liver without immunosuppression. 14<sup>th</sup> World Congress of International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA) (2013.9.24-27. Monterey)
- Hoffecker, I.T., Iwata, H.: Cell Lego. ESF-FEBS Conference on Biological Surfaces and Interfaces. FEBS Workshop, Biologica Surfaces and Interfaces (2013.6.30-7.5. Spain)
- Hoffecker, I.T., Iwata, H.: In vitro control of mouse co-BMSC-islet spheroid organization through ROCK inhibition. 第12回日本再生医療学会総会 (2013.3.21-23. 横浜)
- Hoffecker, I.T., Iwata, H.: Protecting pancreatic islets with immuno-privileged cell types: co-aggregation and manipulation of emergent organization. R-GIRO ミニシンポジウム～革新的アプローチで膵β細胞の生理機能に迫る～ (2013.1.28. 草津)
- Nishimura, H., Kodama, T., Iwata, H.: Comparison of bare metal coil on the rates of intraaneurysmal tissue organization in rat aneurysm model. The 4<sup>th</sup> Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine (2013.1.13-14. Taipei)
- 西村勇人, 児玉智信, 岩田博夫: 脳動脈瘤内の器質化を促進させるスタチン担持コイルの開発. 第35回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11.25-26. 東京)
- 出野 翔, 竹本直紘, 岩田博夫: 単鎖 DNA-PEG-リポソームを用いたビタミンEの血管内皮細胞への送達. 第12回日本再生医療学会総会 (2013.3.21-23. 横浜)
- 出野 翔, 竹本直紘, 岩田博夫: 単鎖 DNA-PEG-脂質複合体を用いた血管内皮細胞内部への高効率なビタミンE送達法. 第62回高分子学会年次大会 (2013.5.29-31. 京都)
- 出野 翔, 竹本直紘, 岩田博夫: 単鎖 DNA-PEG-脂質複合体を用いた抗酸化剤送達による再灌流障害の軽減. 日本バイオマテリアル学会第8回関西若手研究発表会 (2013.8.31. 大阪)

- 出野 翔, 竹本直紘, 岩田博夫: 単鎖 DNA-PEG-脂質複合体を用いた薬剤送達による再灌流障害の軽減. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会(2013.11.25-26. 東京)
- Deno, S., Takemoto, N., Iwata H.: Introduction of antioxidant-loaded liposomes into endothelial cell surfaces through DNA hybridization. The 4th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine (poster presentation) (2013.1.13-14. Taipei)
- Itagaki, T., Iwata, H.: Interaction between Lipid Membranes with Various Membrane Viscosity and Poly(ethylene glycol)-Lipid Conjugates. The 4<sup>th</sup> Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine (2013.1.13-14. Taipei)
- 板垣 亮, 岩田博夫: 種々の流動性を有する脂質膜とポリエチレングリコール-脂質複合体との相互作用. 第 12 回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)
- 板垣 亮, 岩田博夫: ポリエチレングリコール-脂質複合体と流動性の異なる脂質膜との相互作用. 第 62 回高分子学会年次大会(2013.5.29-31. 京都)
- 板垣 亮, 岩田博夫: 脂質部の異なるポリエチレングリコール-脂質複合体と種々の細胞との相互作用. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会(2013.11.25-26. 東京)
- 栞原 令, 竹本直紘, 岩田博夫: 異種膵島移植を目指した膵ランゲルハンス島とセルトリ細胞の共カプセル化. 第 12 回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)
- 栞原 令, 竹本直紘, 岩田博夫: カプセル化した膵島細胞-セルトリ細胞の再凝集体の異種移植. 第 62 回高分子学会年次大会(2013.5.29-31. 京都)
- Kuwabara, R., Takemoto, N., Iwata, H.: Xenotransplantation of encapsulated co-aggregates of Sertoli cells and islet cells. 14th World Congress of International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA) (2013.9.24-27. Monterey)
- 小松光栄, 小長谷周平, 岩田博夫: アガロースカプセル中でのヒト人工多能性幹細胞由来ドーパミン神経の成熟及びその凍結保存. 第 12 回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)
- 小松光栄, 小長谷周平, 岩田博夫: アルギン酸マイクロカプセル内でのヒト iPS 細胞のドーパミン産生細胞への分化誘導. 第 62 回高分子学会年次大会(2013.5.29-31. 京都)
- 松井利樹, 竹本直紘, 岩田博夫: 組織の構築を目指した ssDNA-PEG 脂質による細胞三次元配列の試み. 第 12 回日本再生医療学会総会(2013.3.21-23. 横浜)

## 2) 講演・シンポジウム

- Iwata H.: Cell LEGO. The 4<sup>th</sup> Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine. (2013. 1.14. Taiwan) (招待講演)
- 岩田博夫: Cell LEGO - 細胞から組織を作る -. MEDTEC Japan 2013(2013. 4.25. 東京) (招待講演)
- 岩田博夫: 高分子による細胞表面の修飾と細胞の配置 - Cell LEGO -. 第 51 回関西バイオポリマー研究会(2013. 7.24. 京都) (招待講演)
- Iwata H.: Cell LEGO. Optical MEMS and Nanophotonics 2013(2013. 8.21. Kanazawa) (招待講演)
- 岩田博夫, 板垣 亮, Hoeffcker, I.T., 有馬祐介: ポリエチレングリコール-脂質複合体と細胞との相互作用. 日本化学繊維研究所 第 71 回講演会(2013. 11.12. 京都)
- 岩田博夫: 高分子による細胞表面の修飾と細胞の配置 - Cell LEGO -. 平成 25 年度第 1 回次世代バイオナノ研究会「幹細胞研究と再生医療」(2013. 11.27. 大阪) (招待講演)
- Arima, Y.: Interaction of Proteins and Cells with Model Biomaterials Surfaces, Symposium on Biorecognition and Bioseparation Engineering (Invited lecture) (2013.12.4. Kyoto)

## 生体物性学分野（国内客員） Department of Mechanical Properties

客員教授 佐藤 正明

Visiting Prof. Masaaki Sato

### 【研究概要】

力学的刺激を受けた細胞が形態的および機能的に応答する機構を解明すべく研究を行っている。これまでは主として血管内皮細胞を対象とした研究であり、細胞外から負荷したせん断応力が細胞内をどのように伝搬して、力のセンサーと考えられる焦点接着斑や細胞核に伝達しているのかを最新のイメージング技術を駆使して動的画像化によって捉えた。また、力の伝達に直接関与しているアクチンフィラメントの力学特性等についても詳細に検討している。最近ではこの主題に加えて間葉系幹細胞を対象として流れによるせん断応力が細胞の分化や機能に与える影響についても検討を加えている。本報告では、その結果の一部を紹介する。

この他、血管内留置用ステントの設計理論の開発、大動脈瘤の破裂機構の解明、培養筋管細胞の収縮特性に関する研究なども併せて行ってきた。

#### ヒト間葉系幹細胞の内皮細胞への分化と VEGF 産生能に対する高せん断応力負荷の効果

ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)に力学刺激を負荷することによって細胞の増殖、遊走、アポトーシスが促進されることが報告され、注目を集めている。我々も、どのような化学物質を使うことなく、力学刺激として流れによるせん断応力のみを負荷して、hMSCs が血管内皮細胞の表現型に向かう可能性について検討した。hMSCs に 2Pa のせん断応力を 2 日間に亘って負荷し、その後 5 日間静置培養した。その結果、細胞間接着部位に内皮細胞特有のマーカーである VE-カドヘリンと CD31 の発現を蛍光顕微鏡下に明瞭に観察した。また、ウェスタンブロットによっても 2Pa のせん断応力負荷がフォンビルブランド因子、VE-カドヘリン、CD31 のタンパク質発現を有意に誘導しているという結果を得た(図 1)。これに対して、0.2Pa の低いせん断応力を負荷した場合には、これらの内皮細胞特異的なマーカーの発現は明瞭には観察されなかった。さらに、血管内皮細胞増殖因子である VEGF は MSCs を内皮細胞に分化誘導することが知られているが、せん断応力負荷によって細胞内に蓄積していることが明らかとなった。上述の 2Pa のせん断応力負荷とその後の静置培養による実験系においては、VEGF の増加は対照群に比べて、約 2 倍であった。これらの結果から、高いせん断応力負荷によって VEGF の産生が誘導され、その後 hMSCs から内皮細胞への分化が引き起こされる可能性が示唆された。このような研究は、ティッシュエンジニアリングにおいて細胞分化の過程の理解や細胞供給の手段を検討する上で有用であると考えられる。

Studies in our laboratory have been carried out to elucidate the mechanosensing mechanisms of morphological and functional changes of cells exposed to mechanical forces. We have studied the mechanisms mainly focusing on vascular endothelial cells which locate at the innermost layer of vessel wall and are always exposed to shear stress by blood flow, to tensile/compressive stress by vessel deformation and to hydrostatic pressure by blood pressure. Although endothelial cells have been well investigated from the point of view of mechanobiology by many researchers, the details of the mechanisms are not clear yet. How do external mechanical forces transmit to the



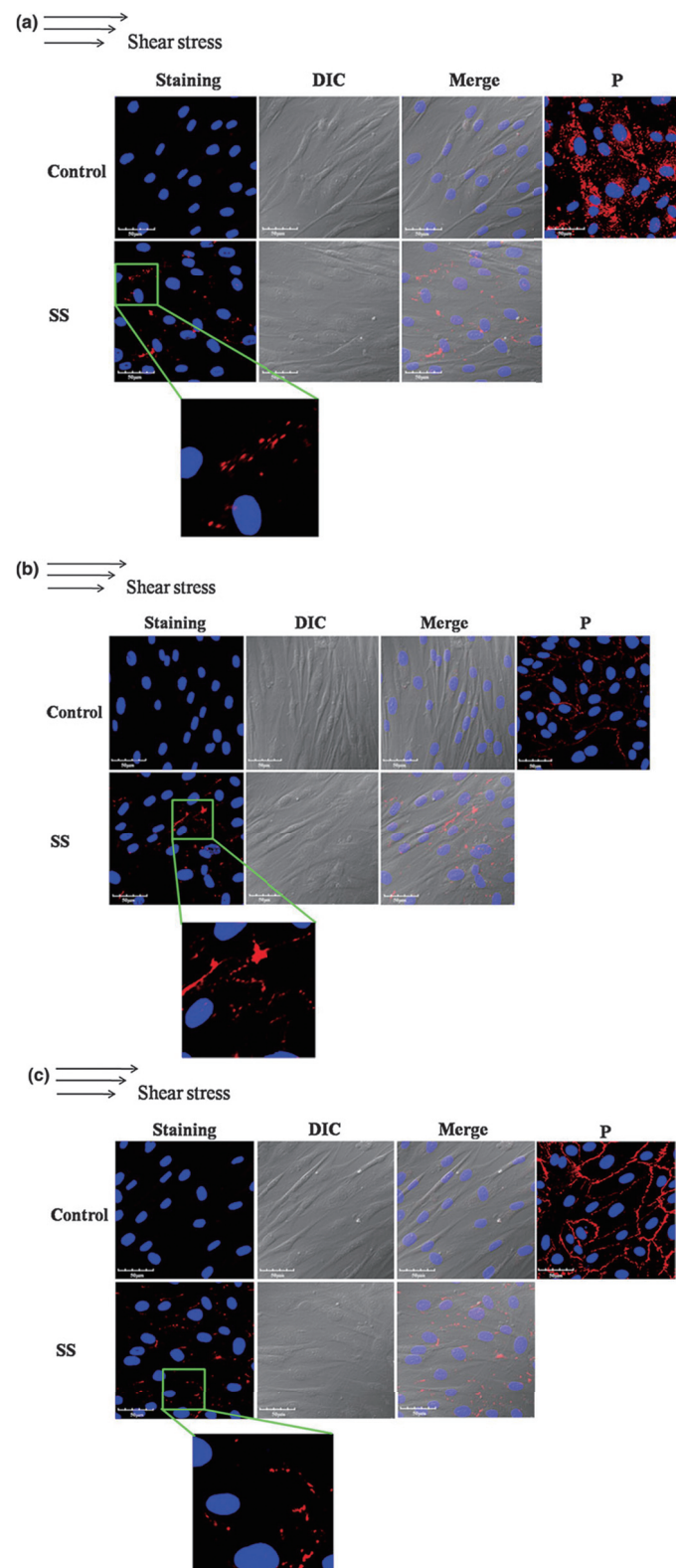


Fig. 1 vWF (a), VE-cadherin (b), and CD31 (c) staining in hMSCs cultured under static conditions (control) or exposed to shear stress (SS) of 2 Pa for 2 days with subsequent culture for 5 days. Staining of ECs cultured under static conditions is shown as a positive control (P). DIC, differential interference contrast; blue, nuclei; red, vWF, VE-cadherin, or CD31. The flow direction is from left to right. Bars = 50  $\mu$ m.

mechano-sensors such as focal adhesions and nucleus? We have clarified the state of deformation and strain in an actin stress fiber using cell imaging technology by confocal laser scanning microscopy. We have examined in detail mechanical characteristics of actin filaments. Recently we have also considered the effects of shear stress due to the flow on the function and differentiation of cells of mesenchymal stem cells. In this report, I introduce a part of this research.

In addition, we have performed the development of the design theory for intravascular stent, elucidation of the rupture mechanism of aortic aneurysm as well as research on the contractile properties of cultured myotubes from the point of view of biomechanics.

### **High-level Shear Stress Stimulates Endothelial Differentiation and VEGF Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells**

Growing experimental evidence suggests that mechanical stimulation plays important roles in determining the proliferation, migration, and apoptosis of human mesenchymal stem cells (hMSCs). We have studied that shear stress stimulates hMSCs toward an EC phenotype in the absence of chemical induction. Most importantly, fluorescence microscopy clearly demonstrated for the first time that the distributions of endothelial-specific markers, vascular endothelial (VE)-cadherin and CD31, in hMSCs were similar to those of ECs at cell-cell adhesion sites after exposing hMSCs to a shear stress of 2 Pa for 2 days with subsequent static culture for 5 days (Fig.1). Western blot analysis proved that shear stress of 2 Pa significantly induced protein expression of von Willebrand factor (vWF), VE-cadherin, and CD31. However, an unclear expression of the endothelial-specific markers was observed in the 0.2 Pa shear stress group. In addition, there was a cumulative production of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is known to induce endothelial differentiation of MSCs. By exerting shear stress of 2 Pa on hMSCs for 2 days with subsequent culture for 5 days, the production level of approximately 2-fold compared with that of the control group was achieved. Our findings suggest that high-level shear stress can induce VEGF production and EC differentiation from hMSCs. This may provide a means for addressing the cell sourcing issue for effective tissue engineering.

## **【業績目録】**

### **◆ 誌上発表 ◆**

#### **1) 原著論文**

杉田修啓, 松本健郎, 増田弘毅, 佐藤正明: 動脈硬化病変を有するヒト冠動脈の血管周方向ひずみ分布計測. 日本機械学会論文集 **79**(798), 177-187, 2013.

杉田修啓, 松本健郎, 佐藤正明: 動脈硬化病変を有する家兎胸大動脈の血管周方向ひずみ分布計測. ライフサポート **25**(2), 56-62, 2013.

D. Yoshino, N. Sakamoto, K. Takahashi, E. Inoue and M. Sato: Development of novel flow chamber to study endothelial cell morphology: Effects of shear flow with uniform spatial gradient on distribution of focal adhesion. Journal Biomechanical Science and Engineering **8**(3), 233-243, 2013.

T. Banjo, J. Grajcarek, D. Yoshino, H. Osada, K.Y. Miyasaka, Y.S. Kida, Y. Ueki, K. Nagayama, K. Kawakami, T. Mat-

- sumoto, M. Sato and T. Ogura : Haemodynamically-dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21. Nature Communications 10 June, 1-11, 2013.
- L. Yuan, N. Sakamoto, G-B. Song and M. Sato : High-level shear stress stimulates endothelial differentiation and VEGF secretion by human mesenchymal stem cells. Cellular and Molecular Bioengineering **6**(2), 220-229, 2013.
- T. S. Matsui, M. Sato and S. Deguchi : High extensibility of stress fibers revealed by in vitro micromanipulation with fluorescence imaging. Biochemical and Biophysical Research Communications **434**, 444-448, 2013.
- A. Farmawati, Y. Kitajima, T. Nedachi, M. Sato, M. Kanzaki and R. Nagatomi : Characterization of contraction-induced IL-6 up-regulation using contractile C2C12 myotubes. Endocrine Journal **60**(2), 137-147, 2013.

## 2) 総説・著書

- 出口真次, 佐藤正明(著者分担): 「バイオメカニクス最前線」(日本機械学会編), 共立出版, 2013.2
- 佐藤正明(著者分担): 生物学辞典(第5版), 岩波書店, 2013.2

---

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- S. Deguchi, T.S. Matsui, D. Komatsu, R. Kaunas and M. Sato : Contractile properties of single stress fibers. BMES-SPRBM Conference on Cellular and Molecular Bioengineering(2013.1.2-5. Hawaii)
- 鶴沼英郎, 古澤利武, 佐藤正明: PET ベース非吸収性 GBR メンブレンの骨誘導再生効果. セラミック基礎科学討論会(2013.1.9-10. 仙台)
- 松井翼, 出口真次, 佐藤正明: ストレスファイバーに関する研究 1. 機能的サンプルの抽出. 第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)
- 出口真次, 松井翼, 小松大貴, 佐藤正明: ストレスファイバーに関する研究 2. 収縮特性とその生理的意義. 第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)
- 齋藤明, 出口真次, 松井翼, 佐藤正明: 細胞-基質間接着分子構造の発達と細胞内張力の関係について. 第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)
- W-J. Huang, S. Deguchi, T.S. Matsui, A.C. Saito and M. Sato : Investigating the molecular mechanism of stress fiber disassembly caused by cyclic stretch. 第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)
- 齋藤 明, 出口真次, 松井 翼, 佐藤正明: 細胞-基質間接着分子構造の発達と細胞内張力の関係について. 第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)
- Xiaobo HAN, 坂元尚哉, 富田典子, Meng Hui, 佐藤正明, 太田 信: せん断応力を負荷した共存培養モデル内の血管平滑筋細胞の形質変化. 第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)
- 中鉢辰也, 阿武俊郎, 坂元尚哉, 出口真次, 佐藤正明: 原子間力顕微鏡を用いた細胞核-アクチンフィラメント結合の評価. 第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)
- 大谷祥一郎, 坂元尚哉, 佐藤正明: 空間的せん断応力勾配下における血管内皮細胞の形態および遊走性の経時観察. 第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)
- 坂元尚哉, 阿武俊郎, 中鉢辰也, 出口真次, 佐藤正明: 内皮細胞における細胞核とアクチンフィラメント結合の生

体力学的検討. 日本生体医工学会専門別研究会バイオメカニクス研究会 146 回研究会 (2013.1.25. 徳島)

A. C. Saito, T. S. Matsui, M. Sato and S. Deguchi : Preliminary analysis for screening mechanosensors in focal adhesions. 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering (2013. 3.23-24. Singapore)

S. Chubachi, N. Sakamoto and M. Sato : Role of nesprin in morphological changes of endothelial cells in response to cyclic stretching. 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering (2013. 3.23-24. Singapore)

## 2) 講演・シンポジウム

M. Sato : My biomechanics research. International Symposium on Bio Medical Engineering Interface. (特別講演) (2013. 3. 14-15. Sendai)

K. Ohashi, H. Abiko, H. Kondo, S. Fujiwara, K. Mashiko, N. Sakamoto, M. Sato and K. Mizuno : Role of nucleus-actin filament binding in endothelial cell responses to cyclic stretching. (招待講演) (2013.3.14-15. Sendai)

T. Banjo, J. Grajcarek, D. Yoshino, H. Osada, K. Y. Miyasaka, Y. S. Kida, Y. Ueki, K. Nagayama, K. Kawakami, T. Matsumoto, M. Sato and T. Ogura : Haemodynamically-dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21. (招待講演) (2013. 3. 14-15. Sendai)

N. Sakamoto, T. Anno, S. Chubachi, S. Deguchi and M. Sato : Role of nucleus-actin filament binding in endothelial cell responses to cyclic stretching. (招待講演) (2013.3.14-15. Sendai)

## 生体物性学分野（国内客員） Department of Mechanical Properties

客員教授 吉田 松生

Visiting Prof. Shosei Yoshida

### 【研究概要】

吉田は2013年度より客員教授として京都大学再生医科学研究所に着任した。本分野では、再生現象の主役である組織幹細胞の実体とその挙動を詳らかにし、自己複製と分化を制御するメカニズムを解明することを目的としている。「組織幹細胞」の正体を知ることによって、そのはたらきを適切に制御する戦略を立てることが可能となり、再生医科学の新たな展開に寄与することが期待される。具体的には、マウス精子幹細胞を研究対象としている。

### 【背景】

精巣に見られる精子形成は、造血系・消化管・皮膚などと共に、ほ乳類において最も活発に細胞がターンオーバーしている組織の一つであり、典型的な組織幹細胞がほぼ個体の一生にわたる長期間の精子形成を支えている。しかし、他の細胞系と同様、幹細胞の正体とその挙動（いかにして自己複製と分化を両立するか）については、必ずしも明らかになっていない。

1960-70年代の固定標本の形態学的研究の結果、ほ乳類精巣に存在する未分化な精原細胞（減数分裂に入る前の体細胞分裂で増殖する段階）は、単独で存在する  $A_{\text{single}} (= A_s)$  細胞と合胞体を含むことが分かった。合胞体はおもに2の $n$ 乗=2, 4, 8, 16...個からなり、分裂の際に細胞質分裂が完了せず姉妹細胞（更に、いとこ、またいとこ...）が連結したまま残ったものと考えられた。1971年には、「 $A_s$  細胞こそが幹細胞であり、合胞体は全て不可逆的に分化する」とする「 $A_s$  モデル」が提案された（図1）。固定標本から細胞の運命を知ることは原理的に不可能である

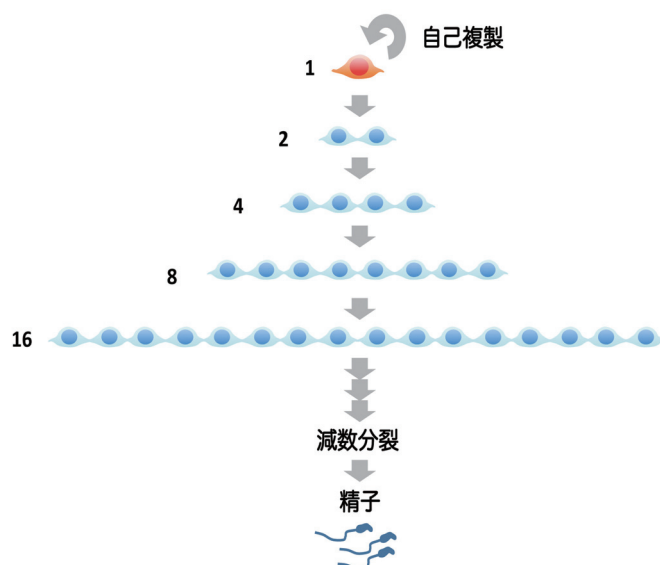


図1  $A_s$  モデル。  $A_s$  のみが幹細胞で、合胞体は不可逆的に分化に方向付けられている。

**Figure1** The “ $A_s$  model”.  $A_{\text{single}}$  (or  $A_s$ ) is the only cell type that acts as stem cells, while interconnected syncytia are thought to be irreversibly committed for differentiation.



が、機能的に評価されることなく、 $A_s$  モデルは教科書的な定説となっている。

吉田らは、マウスの  $A_s$  細胞と未分化な合胞体に局限して発現する遺伝子を利用して、生体内の蛍光標識細胞を連続観察するライブイメージング法、条件的 Cre リコンビナーゼを用いたパルス標識法、という時間を越えて幹細胞を機能的に解析する実験系を確立し、未分化な精原細胞の挙動を解析してきた。その結果、①不可逆的に分化に向かうとされてきた合胞体細胞が断片化することで  $A_s$  細胞に戻る可能性があること、②普段は分化する細胞の「若返り」は組織が障害を受けた後の再生過程において高頻度で観察されること、③これらの幹細胞集団は精巣の中で血管に近接する領域を好んで局在すること、更に、④幹細胞は2週間以内という短い寿命でつぎつぎと入れ替わること、など、新規の知見を見出してきた(Nakagawa et al., Dev. Cell 2007; Yoshida et al., Science 2007; Nakagawa et al., Science 2010; Klein et al., Cell Stem Cell 2010)。これらの知見は、「 $A_s$  モデル」に疑問を投げかけるもので、幹細胞の真のダイナミクスを知ることが改めて重要な課題となっていた。

### 【2013 年の成果】

精巣組織の中で幹細胞機能として機能する集団であろうと強く予想されてきた GFR $\alpha$ 1 陽性細胞(GFR $\alpha$ 1+細胞：図2)の精巣組織内での動態を、ライブイメージング法とパルス標識法を用いて、単一細胞レベルの分解能で定量的に観測した。

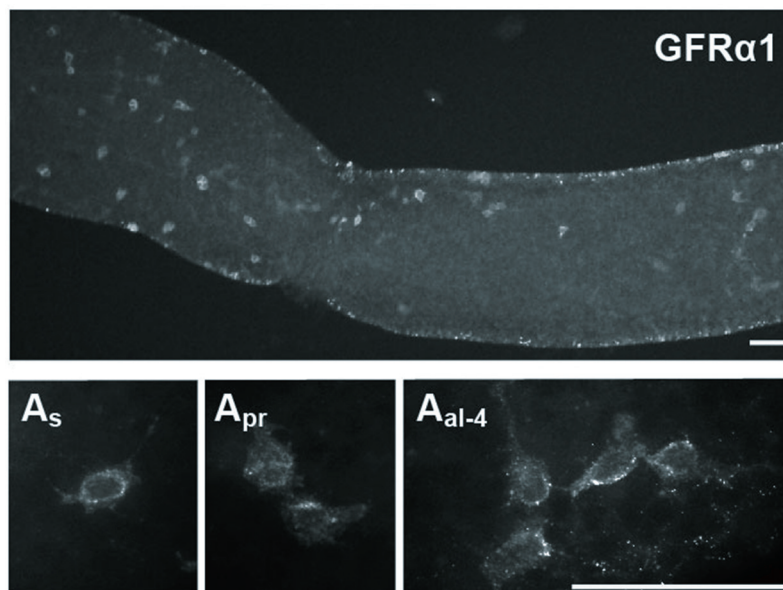


図2 GFR $\alpha$ 1 陽性精原細胞。精細管のホールマウント蛍光免疫染色像。下パネルには、 $A_s$  細胞および合胞体( $A_{pr}$ ,  $A_{al-4}$ )を示す。スケールバーは 50 $\mu$ m。

**Figure2** GFR $\alpha$ 1+ spermatogonia. Immunofluorescence for GFR $\alpha$ 1 in whole-mount seminiferous tubule specimen. Lower, higher magnification of GFR $\alpha$ 1+  $A_s$  and syncytial ( $A_{pr}$  and  $A_{al-4}$ ) spermatogonia. Bars, 50 $\mu$ m.

パルス標識実験の結果、① GFR $\alpha$ 1+細胞の集団は、実際に定常状態の精巣において幹細胞として挙動し、未分化な GFR $\alpha$ 1+細胞自身の数を維持したまま分化細胞を生み出しつづけることが分かった。しかし、②個々の細胞の運命は極めて多様であり、子孫細胞の全てが分化するものも多く観察された一方、多くの GFR $\alpha$ 1+細胞を生み出すものも多かった。これは、GFR $\alpha$ 1+細胞の自己複製と分化のバランスが、単一細胞レベルではなく、細胞集団レベルで達成される「集団非対称」のダイナミクスを示すことを意味する。

更にライブイメージングの結果、③  $A_s$  細胞の分裂のほぼ 100% が合胞体(2細胞)を形成する不完全分裂である

一方、④合胞体は細胞分裂と匹敵する高頻度で断片化して  $A_s$  や短い合胞体を生じる、ことを発見した。これは、 $A_s$  モデルが示唆するような「 $A_s$  細胞の状態であり続ける細胞」は基本的に存在せず、不完全分裂と断片化によって  $A_s$  細胞と合胞体の状態を継続的に行き来することを意味する。

更に、これらの定量的な結果を数理モデリングにより解析した(英国ケンブリッジ大学・物理学科・Benjamin Simons 博士との共同研究)。それにより「幹細胞は  $A_s$  と合胞体の間を恒常的・可逆的に行き来しており、これらの間に機能的な違いはない」という、まったく新しい幹細胞モデルを提唱するに至った(図3: Cell Stem Cell *in press*)。

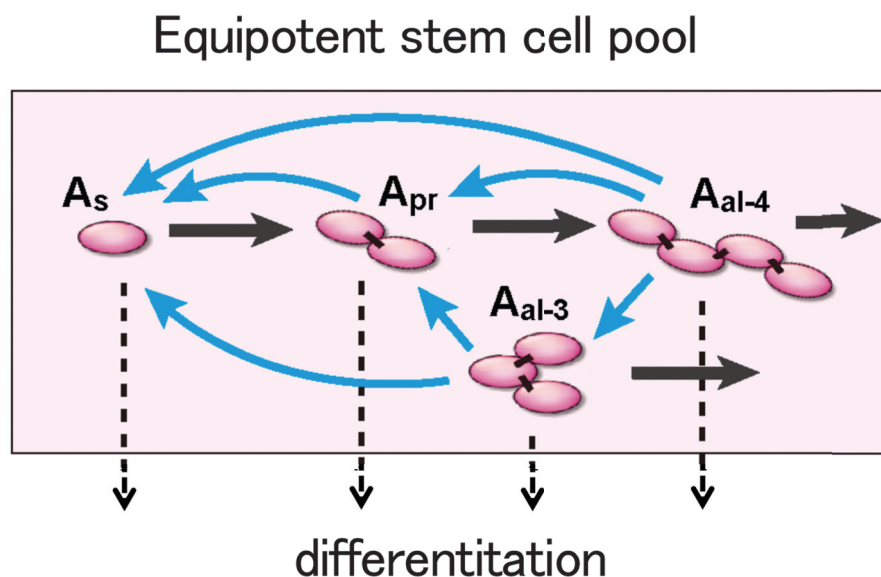


図3 新しく提案する幹細胞モデル。

GFR $\alpha$ 1 陽性精原細胞は一つの幹細胞プールを形成し、不完全分裂(右向き黒矢印)と断片化(左向き青矢印)によって  $A_s$  細胞と合胞体の状態を行き来する。同時に分化細胞を生み出す(下向き点線矢印)。

**Figure3** A proposed stem cell dynamics. GFR $\alpha$ 1+ spermatogonia comprise a single stem cell pool, in which cells continually and reversibly interconvert between states of  $A_s$ ,  $A_{pr}$  and  $A_{al}$  spermatogonia through incomplete cell division (rightward black arrows) and syncytial fragmentation (leftward blue arrows), while giving rise to differentiating cells (downward dotted arrows).

#### 【展望】

以上の成果は、40年以上定説として信じられてきた「 $A_s$  モデル」に変わる新たなパラダイムを提案する。今後、これらが比較され、批判的に評価されることで、精子幹細胞の真の姿に一步でも迫ることができると期待したい。組織幹細胞研究一般の現状を見ると、マウスの腸管、皮膚その他上皮組織、ショウジョウバエの生殖腺や腸管などの組織において、細胞の運命追跡に基づいた幹細胞ダイナミズムの研究が近年急速に進展している。マウス精子幹細胞を対象とする本研究は、これらとしのぎを削りながら、現在の幹細胞研究を牽引している一員となっていると信じている。

#### Research outline

Prof. Yoshida was appointed as a visiting professor of Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University in April 2013. The aim of this department is to reveal the cellular identity and behavior of tissue stem cells, a main player of the regeneration process, and to elucidate the mechanism regulating the self-renewal and differen-

tiation. By knowing the nature of ‘tissue stem cells’, it is expected to contribute to the regenerative medicine by proposing a novel strategy of the stem cell control. In particular, this department is focusing on the mouse sperm stem cells.

**Background :** Spermatogenesis in the testis is one of the most actively turning-over tissues in mammals, as well as hematopoietic, gastrointestinal, and epithelial cells. A typical stem cell system is believed to support the long-lasting spermatogenesis spanning the entire longevity. However, like other stem cell-supported systems, little is known about the cellular nature and the behavior (how to balance the self-renew versus differentiation) of stem cells.

In 1960s to 70s, through the in-depth investigation of fixed specimen, it was discovered that the undifferentiated spermatogonia (spermatogonia are the mitotically dividing cells before entering into meiosis) observed in mammalian testis constitute both  $A_{\text{single}}$  or  $A_s$  cells that are singly isolated, and syncytia including  $2^n$  cells (viz. 2, 4, 8, 16 cells etc.). It was reasonably postulated that such syncytia are formed as a result of incomplete divisions through which mitotic daughters (then cousins, second-cousins and so on) remain interconnected. In 1971, so called the “ $A_s$  model” was proposed, which indicate that  $A_s$  spermatogonia equal to the stem cells, while syncytia are believed to be all irreversibly committed to differentiation. This theory has become prevailing, although it is theoretically impossible to know the cellular fate behavior from fixed specimen only.

By developing experimental systems that allow one to analyze cell behavior over time (viz. live-imaging and pulse-labeling), Yoshida has been investigating the *in vivo* behavior of undifferentiated spermatogonia under the context of undisturbed testis tissue. This is on the basis of identification of genes showing specific expression in  $A_s$  and immature syncytia. As a result, we discovered a number of characteristic features of this population such that 1) syncytial spermatogonia, which have been thought to be irreversibly committed to differentiation, occasionally fragment and give rise to  $A_s$  cells, that 2) “reversion” of usually differentiating cells becomes frequent under regeneration following tissue insult, and that 3) the stem cell populations show preferential localization to vasculature network, and that 4) stem cells continually replace with each other showing short longevity less than two weeks in average (Nakagawa et al., Dev. Cell 2007; Yoshida et al., Science 2007; Nakagawa et al., Science 2010; Klein et al., Cell Stem Cell 2010). These findings have thrown doubt on the “ $A_s$  model”, reviving it as an important question to ask for the true stem cell dynamics in this system.

**Activity in 2013 :** We have analyzed the behavior of  $GFR\alpha 1+$  spermatogonia (which has been postulated to act as the stem cells) in the undisturbed testis at a single-cell resolution, taking advantages of live-imaging and pulse-labeling strategies.

From live-imaging study, we discovered that 1) the population of  $GFR\alpha 1+$  cells continue to produce differentiating cells while maintaining their own population. However, 2) the individual  $GFR\alpha 1+$  cells’ behavior was revealed to be highly variable between clones: in some clones all the descendants differentiated and left the stem cell compartment, while in others, multiple stem cells were generated. This indicates the dynamics of “stem cell population asymmetry”, in which the balance of self-renewal and differentiation is achieved at the level of cell population, rather than at the level of individual cell division.

Then, live-imaging study uncovered that 3) eventually 100% of the  $A_s$  cell divisions were incomplete giving

rise to two-cell syncytia ( $A_{pr}$  cells). On the other hand, 4) the syncytia were observed to fragment into  $A_s$  and shorter chains at an unexpectedly high frequency comparable to that of cell division. Therefore, it is suggested that cells continually interconvert between  $A_s$  and syncytial states, making a stark contrast to the “ $A_s$  model”.

Further, these quantitative data of cell behaviors were analyzed making use of mathematical and statistical analyses, in collaboration with Prof. Benjamin Simons of Cambridge University, UK. The results raised the novel paradigm that  $A_s$  and syncytial GFR $\alpha$ 1+ spermatogonia constitute a single stem cell pool in which cells continually and stochastically interconvert these seeming heterogeneous, but equipotent, states (Figure 3; Cell Stem Cell *in press*).

**Perspectives :** These results propose a novel paradigm of mammalian spermatogenic stem cell dynamics, which challenges the “ $A_s$  model”. Future experimental evaluations of the solidity of these models are very much warranted to get closer to the true nature of the stem cells. Generally in view of the recent stem cell biology, a rapid progress is emerging from the single-cell level lineage analysis in tissues including mouse intestine, skin, or other epithelial tissues, and fruitfly gut and gonads. This study on the mouse spermatogenesis, we believe, is one of the pioneering studies that open the new view in today’s stem cell biology.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Hara, T., Nakagawa, T., Enomoto, H., Suzuki, M., Yamamoto, M., Simons, B. D., Yoshida, S. : Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. Cell Stem Cell *in press*

Shirakawa, T., Yaman-Deveci, R., Tomizawa, S., Kamizato, Y., Nakajima, K., Sone, H., Sato, Y., Sharif, J., Yamashita, A., Takada-Horisawa, Y., Yoshida, S., Ura, K., Muto, M., Koseki, H., Suda, T., Ohbo, K. : An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to exit the undifferentiated state toward a Kit-positive identity. Development **140** : 3565-3576 (2013)

---

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

吉田松生 : マウス精子形成幹細胞の動態とそれを制御する組織内環境 新学術領域研究「配偶子制御」第7回領域会議 (2013.1.23-24. 東京)

吉田松生 : マウス精子幹細胞の集団動態に見る競合と協調 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2013.3.28-30. 高松)

原健士朗, 吉田松生 : マウス精巣における幹細胞のふるまい 第115回日本獣医学会学術集会 (2013.3.28-30. 東京)

Yoshida, S. : Niche microenvironment for the mouse spermatogenic stem cells. The XXII North American Testis workshop “The Foundations of Male Fertility” (2013.4.10-13. San Antonio, Texas)

- Kitadate, Y., Maruyama, A., Ichikawa, R., Yoshida, S.: Characterization of mammalian spermatogenic stem cell niche. The 46th annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB) cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (APDBN) (2013.5.28-31. Matsue)
- Ikami, K., Sugimoto, R., Yoshida, S.: Differential response to Retinoic acid achieves balances self-renewal and differentiation of the stem cell compartment in mouse spermatogenesis. The 46th annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB) cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (APDBN) (2013.5.28-31. Matsue)
- 北館祐, 丸山亜裕美, 市川理恵, 吉田松生: 精子幹細胞ニッチと血管のワイヤリング 新学術領域研究「血管－神経ワイヤリングにおける相互依存性の成立機構」第4回班会議(2013.8.26-28. 大阪)
- 原健士朗, 吉田松生: マウス精子幹細胞の多様な細胞運命 第106回日本繁殖生物学会大会(2013.9.12-14. 東京)
- Hara, K., Yoshida, S.: Maintenance of spermatogenic stem cells follows from dynamic heterogeneity in mouse testis. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Stem Cell Biology (2013.10. 24-28. New York, USA)
- Kitadate, Y., Yoshida, S.: Peritubular cells expressing CXCL12/FGF5 sustain spermatogonial stem cells in mice. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Stem Cell Biology (2013.10.24-28. New York, USA)
- 伊神香菜子, 杉本亮, 吉田松生: レチノイン酸応答性の不均一を幹細胞集団がマウス精子形成を持続させる 日本動物学会第84回大会(2013.9.26-28. 岡山)
- 徳江萌, 吉田松生: マウスの精子形成“潜在的幹細胞”の制御機構 日本動物学会第84回大会(2013.9.26-28 岡山)
- 北館祐, 丸山亜裕美, 市川理恵, 吉田松生: ニッチ微小環境による精子幹細胞の解析 生殖エピゲノム若手勉強会 2013(2013.11.14-15. 大阪)
- Yoshida, S.: Dynamics of the mouse spermatogenic stem cells in seminiferous tubules. IV Workshop on Male Reproductive Biology (2013.11.26. São Paulo, Brazil)
- Yoshida, S.: Towards the understanding of the sperm stem cell niche in the mouse testis. IV Workshop on Male Reproductive Biology (2013.11.27. São Paulo, Brazil)

## 2) 講演・シンポジウム

- Yoshida, S.: Spermatogenic stem cell functionality in the mouse testis. Gurdon Institute, University of Cambridge (2013. 1. 10. Cambridge, UK)
- 吉田松生: マウス精子形成を支える幹細胞の自己複製・分化と挙動におけるケモカインの寄与 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成24年度共同研究報告会(2013.3.15. 京都)
- Yoshida, S.: Stem cell dynamics of mouse spermatogenesis at a single-cell resolution based on live-imaging, clonal fate, and theoretical analyses. The 10th NIBB-EMBL Symposium 2013 Quantitative Bioimaging EMBL (2013.3.17-19. Okazaki)
- Kitadate, Y., Maruyama, A., Yoshida, S.: Polarized distribution of niche microenvironment in seminiferous tubules. 1st International Meeting for Epithelial Tubulology (2013.6.21-24. Sapporo)
- 吉田松生: マウス精子形成幹細胞の正体とふるまい 京都大学ウイルス研究所ウイルス研究の潮流シリーズ講義 (共同利用・共同研究拠点セミナー再生医科学研究所セミナー) (2013.6.26. 京都)
- 吉田松生: Stem Cell Dynamics in Mouse Spermatogenesis: A combination of live-imaging, pulse-labeling, and in silico modeling studies 発生・細胞生物学・システム生物学ジョイントコース多次元定量イメージングに基



づく数理モデルを用いた動的生命システムの革新的研究体系の開発・教育拠点(2013.6.28. 京都)

Yoshida, S.: Toward the fuller understanding of identity and behavior of the mouse spermatogenic stem cells. Sapienza University of Rome(2013.10.23. Rome, Italy)

Yoshida, S.: Spermatogenic stem cell dynamics in the mouse testis. EMBL, Monterotondo(2013.10.25. Monterotondo, Italy)

北館祐, 丸山亜裕美, 市川理恵, 吉田松生: 精子幹細胞を制御する微小環境ニッチの解明 日本発生生物学会秋季シンポジウム 2013(2013.11.18-20. 神戸)

Yoshida, S.: Dynamics of the mouse sperm stem cells and their competition. Universität Basel, Zoologisches Institut(2013.11.19. Basel, Switzerland)

Yoshida, S.: Investigation of the in vivo dynamics of mouse spermatogenic stem cells. Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research(2013.11.21. Basel, Switzerland)

Yoshida, S.: Useful tools to investigate spermatogonial stem cells. Federal University of Minas Gerais(2013.11.29. Belo Horizonte, Brazil)

Yoshida, S.: In vivo behavior of mouse spermatogenic stem cells in testicular microenvironment. Federal University of Minas Gerais(2013.11.29. Belo Horizonte, Brazil)

吉田松生: マウス精子形成を支える幹細胞の正体とその動態 京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成 25 年度学術講演会(2013.12.25. 京都)

# 再生統御学研究部門

## 再生増殖制御学分野 Department of Growth Regulation

分野主任 教授 瀬原(藤沢)淳子

Prof. Atsuko Sehara (Fujisawa)

### 【研究概要】

#### はじめに

発生過程では固有の形や大きさを持った臓器が生ずる。骨格筋など特定の臓器では、それが傷害を受けると再生するが、筋再生においては、筋衛星細胞と呼ばれる幹細胞が活性化され、それが発生過程と類似した細胞分化と形態形成のプロセスによって骨格筋を作り直すことが知られる。

我々の研究室は、主に発生生物学・細胞生物学の立場から、(1)筋分化・筋形成機構、筋再生機構、(2)形態形成における細胞間シグナリング・接着の制御機構とそのプロテアーゼ制御、を2本の柱として研究を行っている。主にマウスを用いた分子遺伝学的手法や培養系による研究とともに、ゼブラフィッシュを用いて、生きた個体でのバイオイメージングによって形態形成過程を蛍光蛋白質により可視化し、発生や再生の新しい仕組みを明らかにしつつある。

- (1) **筋分化と筋形成・再生機構**：現在、成体骨格筋幹細胞の性質や確立機構に焦点を当てた研究を行っている。筋発生過程の筋前駆細胞と同様に、成体骨格筋幹細胞は転写因子 Pax3/Pax7 を発現しているが、発生過程の筋前駆細胞と異なり、これらは通常、細胞増殖が抑制された静止期にある。この骨格筋幹細胞が、筋傷害にともなう炎症細胞の浸潤を契機に、細胞分裂を活性化し、そして分化して筋繊維を作るとともに幹細胞を産生する、これが筋再生である。この筋再生のメカニズムを明らかにするひとつとして、これらのプロセスに関与する miRNA をスクリーニングし、さらにそれらの役割を探ってきた。遺伝学的手法により、胚発生後期より成体にかけて産生される骨格筋幹細胞は、Pax3/Pax7 および MyoD を必要とし、またこれらの遺伝子が活性化される細胞系譜に含まれることが明らかになってきた。そこで、Pax3 発現細胞を GFP、MyoD が活性化された細胞を RFP でモニターしうるマウスを作成し、それらの蛍光発現マウスから GFP 陽性・RFP 陽性の筋幹細胞を単離し、成長に伴う miRNA 発現プロファイルの変化を調べた。それを精査することにより、成体筋幹細胞で発現レベルが顕著に上昇する miRNA の中で骨格筋幹細胞での働きが未だ不明の miRNA を見いだした。筋幹細胞は、GFP 陽性・RFP 陽性細胞として単離されるが、その細胞の性質は、新生仔の時期から成体になるにつれて変化する。その変化は、第一に前者では細胞増殖が盛んであるのに対し後者では著しく細胞増殖が低下し静止期へと移行すること、第二に前者では MyoD タンパク質の発現が見られるのに対し後者ではその発現が抑制されることであった(この際、転写レベルで MyoD 遺伝子の発現履歴のあることは cre によって RFP 陽性に転じていることから確認されている)。そこで、成体で発現の高いこの miRNA を新生仔の筋幹細胞に導入したところ、それらの細胞増殖が著しく阻害されることがわかった。さらに驚いたことに、miRNA を導入した新生仔筋幹細胞では、そこで発現の見られた MyoD タンパク質が著しく抑制され、逆に Pax7 の発現が活性化されることがわかった。つまりこの miRNA は、新生仔筋幹細胞の細胞増殖と MyoD タンパク質

の発現を抑制し、静止期の成体幹細胞様の状態をつくるあるいは維持する活性を持っていたのである。では、この miRNA は、筋幹細胞の再生能に関してどのような効果を持つのだろうか。成体の筋幹細胞は、単離後すぐに再生途中の別個体の骨格筋に移植すると、効率よく再生筋に取り込まれる性質がある。しかし筋幹細胞を単離して細胞培養系に移すと、これらの細胞では、発現していた Pax7 が抑制され MyoD タンパク質の発現が活性化されて、筋細胞分化がおこる。そしていったん MyoD が活性化されると、これらの細胞は移植能を失ってしまうことが分かっている。実際、筋再生の盛んなジストロフィンノックアウトマウス (Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルマウスで、北里大学花岡和則博士より供与を受けたもの) に、培養後の筋幹細胞を移植すると、それらは殆ど再生筋に取り込まれなかった。ところが、成体筋幹細胞にこの miRNA を導入して培養後、再生筋に移植すると、きわめて効率よく再生筋に取り込まれる事がわかった。

以上のように、ドナー個体から他の個体の再生筋に筋幹細胞を移植する際、この miRNA は移植能を向上させる活性を持つことがわかった。このことは、この miRNA の筋幹細胞移植における有用性を示すと同時に、細胞増殖が抑制され、MyoD タンパク質の発現が抑えられた状態、つまり静止期の筋幹細胞の状態を維持することが、筋幹細胞の移植能の上昇につながることを示したものである。(佐藤貴彦の研究より)

- (2) **形態形成における細胞間シグナリング・接着のプロテアーゼ制御**：膜型シグナル分子や接着因子の脂質二重層近傍における切断 (ectodomain shedding) を介して、細胞間シグナリングや接着の制御に関与する、ADAM と呼ばれる膜型プロテアーゼファミリーに着目した研究を行っている。テーマ(1)の中から発展させてきた研究であるが、筋形成にとどまらず、発生の際的空間的制御、不可逆的な制御としてきわめて大切な制御であることを明らかにしてきた。現在神経細胞で発現する ADAM19 の心臓形成や神経組織形成における役割と機能や、マクロファージ等の血液細胞で発現する ADAM8 の役割と機能に関する研究などを行っている。これらの研究においては、マウスとともに、母体外で発生し透明性が高く発生過程を生きたまま観察できるゼブラフィッシュ胚を用いて研究を行っている。それは、発生過程における細胞の挙動をこれらのプロテアーゼがどのように制御しているかを生きた個体の中で調べることができるからである。

#### ゼブラフィッシュを用いた Adam19 の役割と機能に関する研究

これまで、Adam19 がゼブラフィッシュの発生時に側線器官に発現していることを見だし、アンチセンスモルフォリーノオリゴヌクレオチドを用いた遺伝子発現阻害によりその役割・機能解析を行ってきた。その結果、側線神経のミエリン形成を担うシュワン細胞のアポトーシス亢進が認められ、側線神経におけるシュワン細胞の維持に Adam19 が関わっていることが示唆された。しかし、これらの結果はモルフォリーノを用いた遺伝子発現阻害によるものであり、遺伝学的解析がなされていない。そこで、遺伝学的解析を行うために TALEN 法による Adam19 ノックアウトゼブラフィッシュの作製を試みた。

TALEN 法により、様々なタイプの欠失変異体が得られ、Adam19 ノックアウトゼブラフィッシュを確立することができた。確立された Adam19 ノックアウトゼブラフィッシュを解析した結果、モルフォリーノを用いた遺伝子発現阻害実験と同様に、シュワン細胞のアポトーシス亢進が認められた。また、シュワン細胞だけでなく側線神経核にもアポトーシスの亢進が認められた。現在これらの表現型が、神経特異的な Adam19 過剰発現によってレスキュー可能かどうかを検討し、神経で発現する ADAM19 がシュワン細胞の生存に関与することを証明しようとしている。また、側線神経で発現しており、in vitro の系において Adam19 の基質となる膜型増殖因子ニューレグリン (別名グリア増殖因子；NRG1) の切断による活性化に Adam19 が関わっているのではないかと考え、側線神経における NRG1 の局在や切断能を野生型と Adam19 ノックアウトフィッシュ

で比較検討している。さらに、TALEN および CRISPR/Cas9 を用いて NRG1 ノックアウトフィッシュ、Adam 19 と機能的重複が予想される Adam ファミリー遺伝子のノックアウトフィッシュを作製中である。(佐藤文規の研究より)

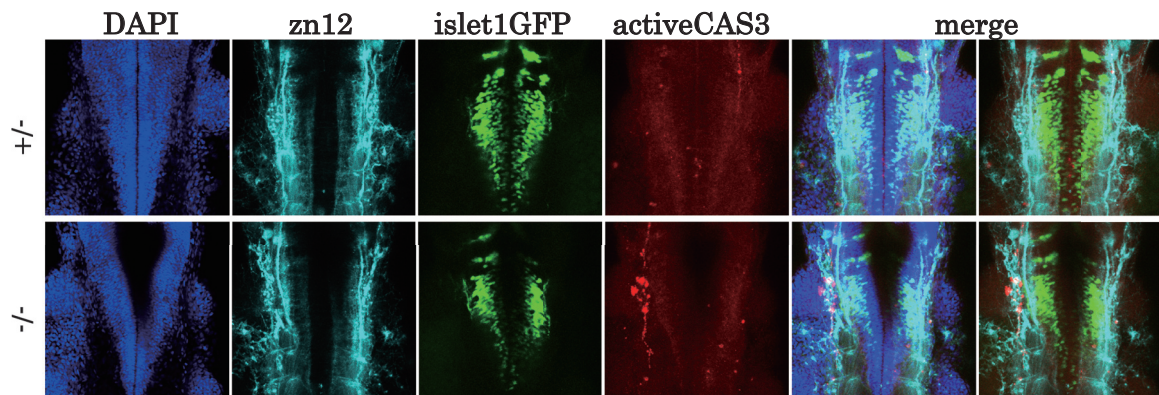


図1 ADAM19 はシュワン細胞の生存に関与する

野生型(上段)・ADAM19 ノックアウトゼブラフィッシュ(下段)36 時間胚を、核(DAPI, 青), 神経堤細胞(zn12, マゼンダ), アポトーシス細胞(活性型カスパーゼ 3, 赤), で染色したもの(右 2 つのパネルはそれらを重ね合わせた画像)。ADAM19 欠損は、細胞死の亢進を引き起こしている。

- (3) 発生・再生などの研究に有用な透明ゼブラフィッシュ *casper* 系統の作成：ゼブラフィッシュは透明な胚が体外で発生し、受精後 1~2 日で基本的な体の構造が完成することから、発生学分野で急速に普及したモデル動物である。本分野でも 2006 年にゼブラフィッシュの実験系を立ち上げ、発生初期のライブイメージングをメインに形態形成および細胞動態の研究を行ってきた。これまでは主として血管・血球により構成される循環器系に焦点を当て、膜型プロテアーゼ ADAM8 因子によって制御される細胞間相互作用が血液循環開始に重要であることを明らかにしている (Iida et al., *Curr. Biol.*, 2010)。ただ、ゼブラフィッシュは個体発生を研究する上で有用なツールではあるが「透明なのは初期胚だけで、受精後 2 日目には体表の色素が観察の邪魔をする」「狙った遺伝子を破壊するノックアウト手法が確立されていない」など、他のモデルに比べて優位性を確保できない点も存在した。ところが近年になり、これらの不利を埋める新たな材料・技術の開発が目覚ましい。そこで本分野でもこれらの材料・技術を導入して、新しい実験系の構築を進めている。

ゼブラフィッシュの体表面にはメラノフォア(黒), キサントフォア(黄), イリドフォア(虹)の三種類の色素により縞模様が形成される。特に受精後約 36 時間から出現するメラノフォアは、蛍光イメージングの大きな障害となる。メラニン合成阻害剤 PTU(1-phenyl 2-thiourea)処理も有効であるが、受精後 3~4 日より出現する他の色素の出現は抑制することはできない。そこで本分野では、成魚でも体の内部構造が観察可能な透明変異体 *casper* (White et al., *Cell Stem Cell*, 2008)の使用を検討した。*casper* は神経堤細胞由来の全ての色素細胞を欠く変異体で、体色以外に目立った表現型は報告されていない(図 2)。我々は血管が GFP で可視化されたトランスジェニックゼブラフィッシュと *casper* を交配し、これまで観察できなかった成魚の血管系のライブイメージングに着手している。現在までに、独自に開発した *flk-1*:Lifeact-GFP 系統を用いることで、成長後も明瞭に血管網が観察することが可能となった(図 3, 図 4)。これまでゼブラフィッシュでは狙った遺伝子を破壊するノックアウトの手法が確立されておらず「モルフォリノオリゴによる一過的なノックダウン」もしくは「ENU によるランダム変異導入」による機能欠失実験が主であった。前者は初期胚の観察には有用であるが、成長後に観察される表現型の解析には向かず、後者は得られる変異が偶発的であるため、特定の遺伝子破壊や既知の疾患に関する魚類モデル作成などの目的には不向きであった。だが近年、TALEN や CRISPR/Cas9 な



どの人工ヌクレアーゼを用いた簡便な遺伝子ノックアウト法がゼブラフィッシュにおいても開発され、それが可能となった (Bedell et al., *Nature*, 2012, Hwang et al., *Nat. biotechnol.*, 2013). 我々は現在, ADAM プロテアーゼ因子を遺伝的に破壊したノックアウトゼブラフィッシュの作成を進めている. これらを透明トランスジェニック系統と掛け合わせることで, 発生から成熟に至るまでを生きた状態で観察・解析することが出来ると見込んでいる. (飯田敦夫の研究より)

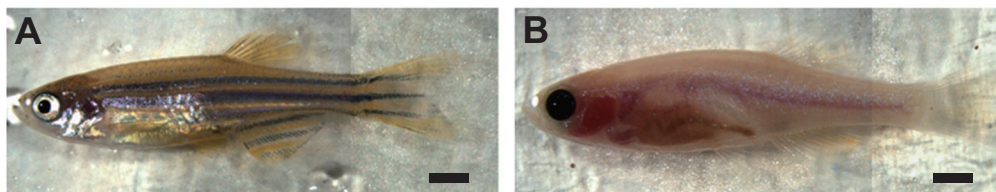


図2 ゼブラフィッシュ成魚の体色の比較  
A: 野生型. B: *casper* 変異体

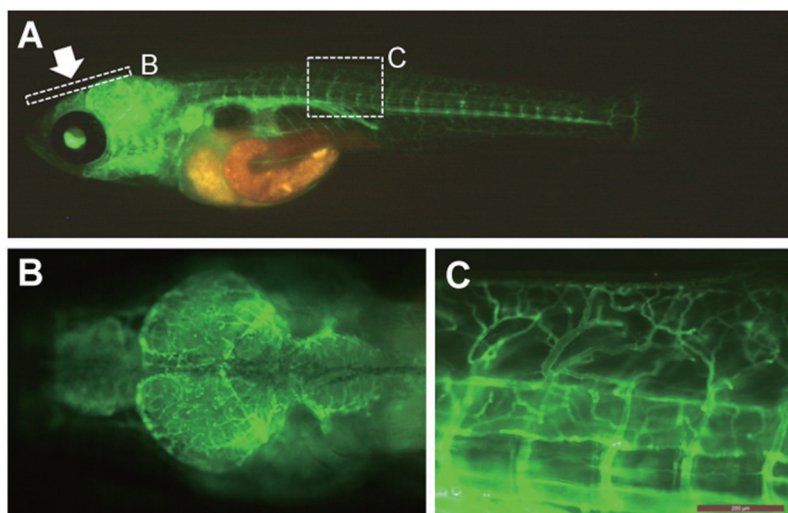


図3 血管可視化 *casper* 変異体の蛍光実体顕微鏡像  
A: 孵化後1ヶ月の全身蛍光像. B: 頭部血管の背面像. C: 背部血管の側面像

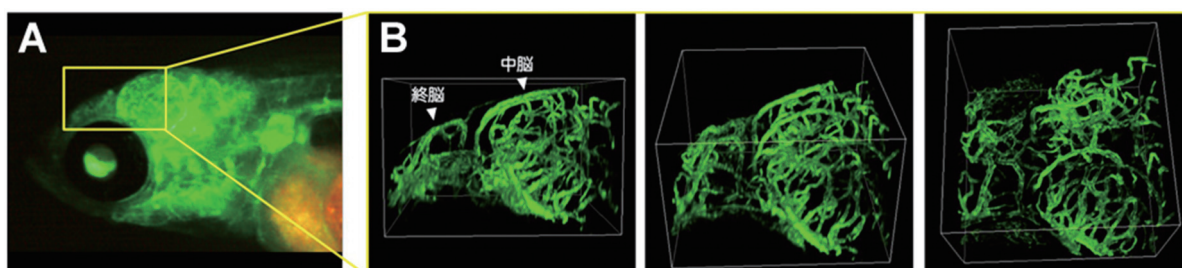


図4 血管可視化 *casper* 変異体の3D撮影像  
A. 実体顕微鏡による頭部側面像. B. 多光子顕微鏡による3D撮影像

We are interested in molecular and cellular mechanisms of organ development and regeneration, especially from an aspect of cell-cell interactions required for morphogenesis and their spatial and temporal regulation. Our research is now focusing on following topics: (1) molecular mechanisms of skeletal myogenesis and muscle regeneration, and (2) regulatory roles of ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) family proteins in cell-cell interactions and the ectodomain shedding during development.



**(1) Molecular mechanisms of skeletal myogenesis and muscle regeneration**

Adult skeletal muscle stem cells (MuSCs), the major cellular source for skeletal muscle regeneration, are kept cell cycle arrested in muscle tissues except when they break the quiescence upon myofiber injury or under pathogenic condition such as Duchenne Muscular Dystrophy. Evidence suggests that embryonic skeletal muscle progenitor cells proliferate and differentiate to form myofibers and give rise to MuSCs as well, implying that their quiescence is acquired during development. Depletion of Dicer in adult MuSCs caused a transient increase in their proliferation, suggesting involvement of miRNAs in the MuSC quiescence. Screening of miRNAs of which expression was increased in MuSCs during juvenile to adult phase transition enabled us to identify miRNAs that convert juvenile proliferating MuSCs into those in quiescent states through targeting cell cycle genes. Quiescence-induced juvenile MuSCs with those miRNAs exhibited biochemical properties of quiescent adult MuSCs, increased and decreased expression of Pax7 and MyoD proteins, respectively. Transplanted MuSCs treated with those miRNAs contributed more efficiently to regenerating muscles of Dystrophin-deficient mice, suggesting potential utility of those miRNAs in the maintenance of quiescence and stemness of MuSCs in stem cell therapies of muscle diseases.

**(2) Regulatory roles of ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) family proteins in cell-cell interactions and the ectodomain shedding**

We are investigating roles of ADAM19/Meltrin beta in development and regeneration of the heart and nervous system and its function as a “shedase” and a regulator of cell-cell interactions in these developmental processes now. ADAM19 participates in the multiple processes including heart development, formation of neuromuscular junction, and Schwann cell differentiation during regeneration in mice. However, how ADAM19 regulates Schwann cell differentiation remains elusive. In order to elucidate roles of ADAM19 in Schwann cell differentiation, we established ADAM19-deficient zebrafish using TALEN technology. Live imaging of lateral nerves revealed that GFP-labeled Schwann cells migrated along axons, and then, myelinated. In the absence of ADAM19, Schwann cells migrated but frequently ruptured during migration. These ruptured cells were caspase-3 positive apoptotic cells. Dying cells were also observed in lateral nerve ganglia. These results suggest that ADAM19 is involved in the survival of Schwann cells during development. Previous studies showed that Schwann cell survival requires Neuregulin1-ErbB signaling in mice. We confirmed that dying Schwann cells increased prominently in type-1 Neuregulin-knockdown embryos. Taken together with our previous finding that ADAM19 has an activity of the ectodomain shedding of type-1 Neuregulin1, we currently hypothesize that ADAM19 regulates Schwann cell survival through the ectodomain shedding of type1 Neuregulin.

**【業績目録】****◆ 誌上発表 ◆****1) 原著論文**

Wakatsuki, S., Araki, T., Sehara-Fujisawa, A., Neuregulin-1/Glia1 Growth Factor stimulates Schwann Cell Migration by including the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin-ErbB2-Focal Adhesion Kinase Complex Formation. *Genes to Cells*, 2013.

Sakai, H., \*Sato, T., Sakurai, H., Yamamoto, T., Hanaoka K., Montarras, D., \*Sehara-Fujisawa, A., Fetal Skeletal Mus-

cle Progenitors Have Regenerative Capacity After Intramuscular Engraftment in Dystrophin Deficient Mice. PLoS ONE, 2013: 8(5) : e63016.

Tanaka, A., Woltjen, K., Miyake, K., Hotta, A., Ikeya, M., Yamamoto, T., Nishino, T., Shoji, E., Sehara-Fujisawa, A., Manabe, Y., Fujii, N., Hanaoka, K., Era, T., Yamashita, S., Isobe, K., Kimura, E., and \*Sakurai, H. Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. PLoS ONE, 2013: 8(4) : e61540.

---

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

飯田敦夫：ゼブラフィッシュの血液循環システム構築に伴う細胞間相互作用の解析，文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」第6回班会議(2013.1.21. 兵庫県)

Tomomi Sato: ErbB Signaling Regulates Generation of Neurons during Development of the Optic Tectum in Zebrafish. The 23rd CDB Meeting "Building multicellular systems from cellular cross-talk"(2013.1.22. 兵庫県)

西邨大吾：Roles of ADAM8 for skeletal muscle regeneration. 5 拠点ミーティング(2013.2.4. 兵庫県)

佐藤貴彦：骨格筋幹細胞の形成に関与する転写後調節機構，5 拠点ミーティング(2013.2.4. 兵庫県)

Tomomi Sato: NRG1-ErbB Signaling Regulates Generation of Neurons in the Optic Tectum of Zebrafish during Development. CDB Symposium 2013 "The Making of a Vertebrate"(2013.3.5. 兵庫県)

飯田敦夫：血管内皮細胞－赤芽球間の接着を基盤とした細胞分化・増殖の相互制御機構，文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「動く細胞と場のクロストークによる秩序の生成」第2回若手の会(2013.3.7. 静岡県)

佐藤貴彦，瀬原淳子：骨格筋幹細胞の形成に関与する転写後調節機構探求，第12回日本再生医療学会総会(2013.3.22. 神奈川県)

Anna Tomosawa, Atsuo Iida, Atsuko Sehara-Fujisawa: A transmembrane metalloprotease ADAM10a regulates behaviors of primitive erythroblasts and vascular formation in zebrafish development. 第46回日本発生物学会年会(2013.5.30. 鳥根県)

Hanako Naito, Yoko Ueda, Takahiko Sato, Atsuko Sehara-Fujisawa, Masasuke Araki: Amphibian retinal regeneration is triggered by matrix metalloproteinases. 第46回日本発生物学会年会(2013.5.30. 鳥根県)

Takahiko Sato, Takuya Yamamoto, Atsuko Sehara: The investigation of post-transcriptional process to form adult skeletal muscle stem cells. 第46回日本発生物学会年会(2013.5.31. 鳥根県)

飯田敦夫：ゼブラフィッシュ脈管形成における膜型プロテアーゼ ADAM10 の役割，新学術領域研究「血管－神経ワイアリングにおける相互依存性成立機構」第4回班会議(2013.8.27. 大阪府)

瀬原淳子：神経組織形成における膜型プロテアーゼ ADAM19 の役割，新学術領域研究「血管－神経ワイアリングにおける相互依存性成立機構」第4回班会議(2013.8.28. 大阪府)

飯田敦夫：ゼブラフィッシュを用いた ADAM10 プロテアーゼ遺伝子の解析，日本発生物学会 2013 年秋期シンポジウム(2013.11.18. 兵庫県)

2) 講演・シンポジウム

Atsuko Sehara: Exploring roles of ADAM proteases in development using zebrafish. 国際高等研究所研究プログ

ラム「ゲノム工学とイメージングサイエンスに基づく生命システム研究の新展開」2012年度第1回研究会  
(2013.2.23. 京都府)

飯田敦夫：メダカのトランスポゾン Tol2 の内在性転移について，奈良先端科学技術大学院大学セミナー(2013.7.12.  
奈良県)

瀬原淳子：生命誕生の設計図を解く，第6回形態科学シンポジウム「医学・生物学研究の魅力を語る：高校生のた  
めの集い」(2013.10.12. 京都府)

Fuminori Sato, Hiroyuki Kangawa, Hiroyuki Arai, Kazuya Tsumagari, Atsuo Kawahara, Koichi Kawakami, Atsuko  
Sehara-Fujisawa: Roles of ADAM Proteases in Development of zebrafish. the 8th General Meeting of the  
International Proteolysis Society (2013.10.23. Cape Town, South Africa)

Atsuko Sehara-Fujisawa: exploring Roles of ADAM Proteases Using Zebrafish. Swiss-Kyoto Symposium (2013.11.21.  
Zurich, Swiss)

Atsuko Sehara-Fujisawa: exploring Roles of ADAM Proteases Using Zebrafish. 国立台湾大学－京都大学シンポ  
ジウム (2013.12.20. 台北市, 台湾)

## 再生免疫学分野 Department of Immunology

分野主任 教授 河本 宏  
Prof. Hiroshi Kawamoto

### 【研究概要】

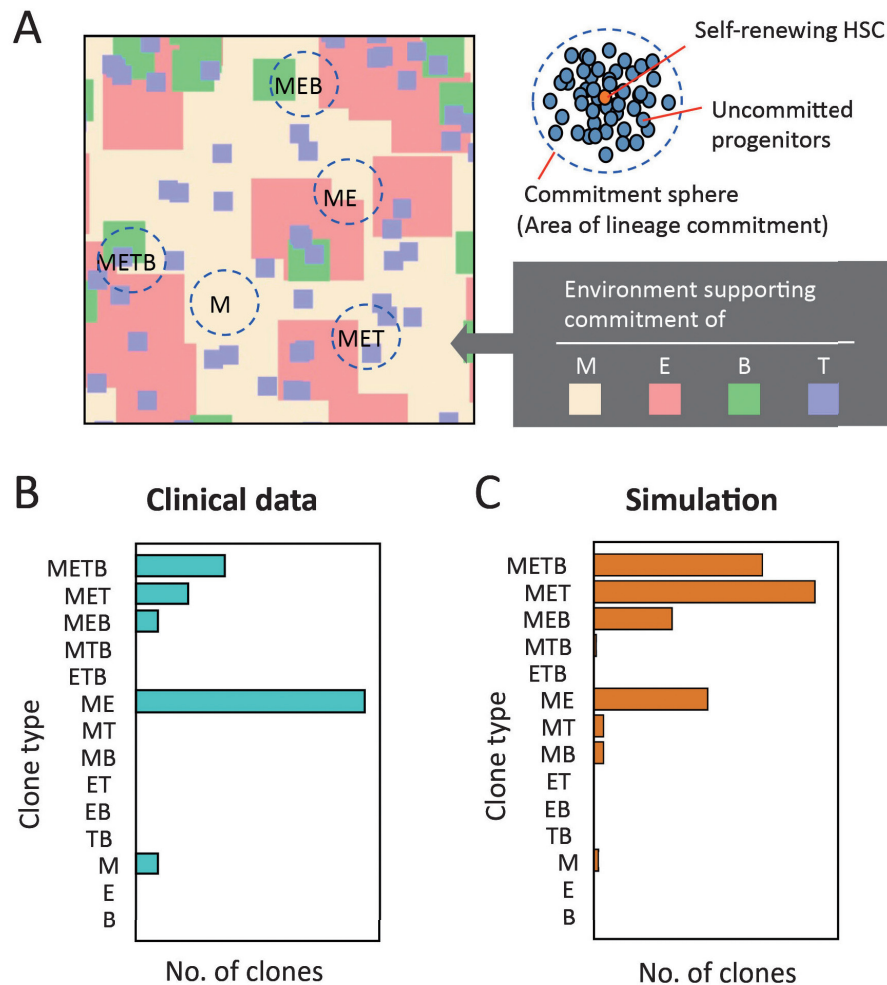
造血においては多能造血幹細胞から順次分化能が限定されていき、いろいろの系列の単能前駆細胞が生成する。我々の研究室が目標としていることは、この分化能限定過程において、前駆細胞の運命を振り分ける分子機構を解析することである。我々は研究成果に基づいて新しい造血モデルとして「ミエロイド基本型モデル」を提唱してきた。一般に流布してきた古典的造血モデルとは異なり、このモデルでは、エリスロイド、T細胞、B細胞への分化に向かう経路において、ミエロイド細胞への分化能を保持するとしている。造血過程の全体を研究対象としているが、中でもT細胞に至る過程に比重を置いて研究を進めている。2013年には以前から金沢大との共同で進めてきたヒト骨髄における造血幹細胞の動態に関する研究の成果を報告した(Katagiri et al, Stem Cells, 2013)。以下にこの研究について紹介する。

#### ・iPS細胞技術を用いてがん抗原特異的T細胞を再生させる

造血幹細胞(HSC)は、分裂に際して一方で自己複製し他方で多能前駆細胞となることにより、造血を維持すると考えられている。また、多くのHSCは休眠中で、一部だけが造血に貢献している事も知られている。しかしながら、恒常的な造血の中で「個々のHSCは全ての系列の細胞をつくっているか」は不明であった。我々はHSCに稀に起こるPIG-A遺伝子欠損に注目した。PIG-A遺伝子欠損HSCはGPIアンカー型のタンパク質(GPI-AP)を発現できなくなるので、その子孫細胞はFACSによって検出できる。GPI-AP陰性細胞は健常人では稀であるが、再生不良性貧血(AA)や骨髄異形成症候群(MDS)では出現頻度が高い。

計574人のAAあるいはMDSの患者の末梢血を、6種類の系列＝[好中球(G)、単球(M)、赤血球(E)、T細胞(T)、NK細胞(NK)、B細胞(B)]について調べたところ、250人でGPI-AP陰性細胞が検出された。興味深いことに、殆どの例で限られた系列にしか見られなかった。さらに、6ヶ月－18ヶ月の間隔をあけて再検査したところ、全ての症例において同じ組み合わせの系列が検出された。長期間造血が維持されている事から、これらのGPI-AP陰性細胞は前駆細胞ではなくHSCに由来すると思われる。系列の組み合わせは16タイプあり、限定例の中ではG-M-E、G-E、G、G-M、G-M-E-NK、G-M-E-Bなどが比較的高頻度にみられた。限られた系列だけ産生している事を、HSCの内因的な能力の差の反映とみることもできるが、我々は系列決定を誘導する微小環境のモザイク性の反映というモデルでも説明できると考えている。これをモザイク系列決定誘導微小環境モデルと名付けた。このモデルに基づいてシミュレーションを行った結果は、臨床データによく合致していた(図1)。患者で見られた現象ではあるが、AAやMDSの中でもGPI-AP陰性細胞がみられる(すなわち免疫によるHSCの攻撃が病因である)症例では骨髄環境自体は本質的に正常と考えられ、またGPI-AP陰性HSCも造血能自体は正常と考えられている。さらに、「限られた系列の造血」はAAの軽症例でも重症例でも同じように見られ、また2例だけではあるが健常人でもみられた。従って、正常造血の動態も同様であろうと考えている。

The major aim of our laboratory is to elucidate the molecular mechanisms that regulate cell fate decisions in



**図 1** モザイク系列決定誘導微環境モデルに基づいたシミュレーションにより、実際のデータに良く似たクローンを再現することができた

- A. 骨髄の造血環境は系列決定誘導能力において不均一であるとするモデル。1個の造血幹細胞からつくられる系列決定前の前駆細胞が分散するエリアを「系列決定スフェア」と呼ぶ。骨髄環境のうちベージュ、ピンク、緑、青に塗り分けられたエリアはそれぞれミエロイド(M)、エリスロイド(E)、B、T系列への決定を誘導する環境とする。もしも造血幹細胞がたまたま周囲にM環境とE環境しかないような場所に存在してそこで造血を行うとすると、この幹細胞はミエロイド細胞とエリスロイド細胞しかつくれないことになる。
- B. 実際の臨床データ。GPI アンカー蛋白陰性の細胞がみられた系列の組み合わせをクローンタイプとして、100人分について、それぞれのタイプの頻度を表している。
- C. Aに示したモザイク環境パターンに基づいてシミュレーションを行った結果を示す。計100個の造血幹細胞を図の中にランダムに固定し、個々の造血幹細胞の造血動態をシミュレーションする。造血幹細胞から生じた娘細胞はランダムに動きまわりながら運命決定前の前駆細胞として数回分裂し、その後環境に応じて系列決定される。系列決定後も数回の増殖を行い、その後分化成熟する。臨床例と同じタイプのクローンが出現している。

**Fig. 1 Simulation of HSC differentiation in a model assuming a mosaic environment for the commitment of primitive progenitors recapitulates the clinical observation.**

- A. A model assuming that the bone marrow microenvironment is heterogeneous in supporting the commitment of progenitors. A certain range where the commitment of progenitors mainly occurs is termed the "commitment sphere". Area colored by beige, pink, light green, or blue represents the environment supporting commitment only towards myeloid (M), erythroid (E), B or T, respectively. If a HSC happens to reside in a location in which the commitment sphere contains only M and E regions, then this HSC can eventually produce only M and E cells, even if committed progenitors expand enormously and become widely scattered.
- B. Frequency of clone types bearing GPI-APs<sup>-</sup> cells in a total of about 100 patients.
- C. One example illustrating the frequency of clone types simulated in a mosaic pattern shown in (A). A total of 100 virtual HSCs were simulated to form hematopoietic clones, and numbers of the resulting clone types are illustrated. The simulation goes as follows: a virtual HSC undergoes several cell divisions at fixed intervals while randomly migrating. The uncommitted progenitors then undergo a fate decision based on their ultimate location. Committed progenitors can also randomly move around. After several additional fixed time cell divisions as committed progenitors, cells become mature. Note that similar types of clones to clinical samples shown in (B) are recapitulated in the simulation.



the process of lineage restriction from multipotent hematopoietic stem cells to unipotent progenitors. A series of studies from our laboratory on early hematopoiesis have led to a fundamental redefinition of lymphoid progenitors as well as the ontogeny and phylogeny of T- and B-cell development. We thus have proposed our original model of hematopoiesis, namely “myeloid-based model”, in which myeloid potential is retained along with specification pathway towards erythroid, T, and B cell lineages. Among various events occurring during hematopoiesis, we are mainly focusing on the process towards the production of T cells. In 2013, we have published one paper that has focused on the dynamics of hematopoietic stem cells in human bone marrow in collaboration with Kanazawa University. Here we introduce this study.

### **Individual hematopoietic stem cells in human bone marrow of patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome stably give rise to limited cell lineages**

Mutation of the *PIG-A* gene in hematopoietic stem cells (HSCs) results in the loss of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-APs) on HSCs, but minimally affects their development, and thus can be used as a clonal marker of HSCs. We analyzed GPI-AP expression on six major lineage cells in a total of 574 patients with bone marrow (BM) failure in which microenvironment itself is thought to be unaffected, including aplastic anemia (AA) or myelodysplastic syndrome (MDS). GPI-AP-deficient (GPI-APs<sup>-</sup>) cells were detected in 250 patients. Whereas the GPI-APs<sup>-</sup> cells were seen in all six lineages in a majority of patients who had higher proportion (>3%) of GPI-APs<sup>-</sup> cells, they were detected in only limited lineages in 92.9% of cases in the lower proportion (<3%) group. In all 250 cases, the same lineages of GPI-APs<sup>-</sup> cells were detected even after 6-18 month intervals, indicating that the GPI-APs<sup>-</sup> cells reflect hematopoiesis maintained by a self-renewing HSC in most of cases. The frequency of clones with limited lineages seen in mild cases of AA was similar to that in severe cases, and clones with limited lineages were seen even in two health volunteer cases. These results strongly suggest most individual HSCs produce only restricted lineages even in a steady state. While this restriction could reflect heterogeneity in the developmental potential of HSCs, we propose an alternative model in which the BM microenvironment is mosaic in supporting commitment of progenitors towards distinct lineages. Our computer simulation based on this model successfully recapitulated the observed clinical data (Figure 1).

## **【業績目録】**

### **◆ 誌上発表 ◆**

#### **1) 原著論文**

Okuyama K, Ikawa T, Gentner B, Hozumi K, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A. MicroRNA-126-mediated control of cell fate in B-cell myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110** : 13410-13415, 2013.

Katagiri, T.\*, Kawamoto, H.\*, Nakakuki, T.\*, Ishiyama, K., Okada-Hatakeyama, M., Ohtake, S., Seiki, S., Hosokawa, K. Nakao, S. (\*equal contribution) Individual hematopoietic stem cells in human bone marrow of patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome stably give rise to limited cell lineages. *Stem Cells*. **31** : 536-

546. 2013.

Vizcardo, R., Masuda, K., Yamada, D., Ikawa, T., Shimizu, K., Fujii, S-I., Koseki, H., Kawamoto, H., Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPS cells derived from mature CD8<sup>+</sup> T cells. Cell Stem Cell. **12** : 31-36. 2013.

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

増田 喬子：iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的 T 細胞の再生 科学研究費新学術領域「免疫四次元空間ダイナミクス」第1回サマースクール(2013.7.13-14. 徳島)

Masuda, K., Vizcardo, R., Kawamoto, H., : Regeneration of human melanoma antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8<sup>+</sup> T cells 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology (2013.8.22-27. Milan)

増田 喬子：HLA ハプロタイプホモドナーからヘテロへの移植における免疫反応の検証と制御法の開発 再生医療実現化ネットワーク拠点事業夏のワークショップ(2013.9.3-4. 浜松)

### 2) 講演・シンポジウム

河本 宏：iPS細胞の現状と今後の展望 神奈川県薬剤師会研究発表会 特別講演(2013.1.26 横浜)

河本 宏：血液細胞の新しい分化モデルーミエロイド系/リンパ系二元論的モデルからの脱却ー 再生/発生5拠点ミーティング(2013.2.5. 有馬)

河本 宏：造血幹細胞から T 前駆細胞に至る系列決定の過程 IGM 免疫生物分野講演会(2013.2.8. 札幌)

河本 宏：胸腺上皮細胞と胸腺嚢胞 日本胸腺研究会 特別講演(2013.2.9. 札幌)

河本 宏：免疫学における新しい考え方 京滋免疫血液勉強会(2013.2.21. 京都)

河本 宏：iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的 T 細胞の再生 iPS細胞産学合同研究会(2013.3.28. 京都)

河本 宏：Close relationship between myeloid and lymphoid lineages Nikolas Symposia(2012.5.10. Athens)

河本 宏：T細胞系列への決定と維持の分子メカニズム 新学術領域細胞運命制御 領域会議(2013.5.21. 鳴門)

河本 宏：iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生 北九州がんセミナー(2013.5.22. 神戸)

河本 宏：Molecular mechanisms for production and maintenance of T cell lineage International Workshop of KTCC 2013(2013.6.4. 京都)

河本 宏：Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology EHA Scientific Working Group (2013.6.13. Stockholm)

河本 宏：血液細胞の新しい分化モデル 化学生命工学特別講演会(2013.6.18. 岡山)

河本 宏：血液細胞の新しい分化モデル 京大病院循環器内科セミナー(2013.6.19. 京都)

河本 宏：造血幹細胞から T 前駆細胞に至る系列決定の過程 山口大学特別専門講義(2013.6.24. 山口)

河本 宏：T細胞系列の維持におけるエピジェネティックな制御 新学術領域免疫四次元空間領域会議(2013.7.10. 京都)

河本 宏：T細胞のルーツ探しの旅 新学術領域免疫四次元空間サマースクール(2013.7.11. 徳島)

河本 宏：iPS細胞からがんを殺す T 細胞を再生！ 再生医科学研究所第8回公開講演会(2013.7.20. 京都)

河本 宏：iPS細胞からがんを殺す T 細胞を再生する 沼津 Leukemia Seminar(2013.7.26. 沼津)

- 河本 宏：iPS 細胞からがんを殺す T 細胞を再生－がんの免疫療法を革新する可能性－ Legend Seminar in 京都 (2013.7.30. 京都)
- 河本 宏：ぱっちりわかる！免疫学～免疫学の基礎から免疫療法の最前線まで～ 日本生物教育会全国大会 2013 東京大会 (2013.8.7. 東京)
- 河本 宏：iPS 細胞からがんを殺す T 細胞を再生 ヒト細胞学会 (2013.8.11. 所沢)
- 河本 宏：iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的 T 細胞の再生 BD 学術セミナー 2013 (2013.8.30. 東京)
- 河本 宏：A revised scheme for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis – Insight into the origin of mixed phenotype acute leukemia－ 日本血液学会シンポジウム (2013.10.13. 札幌)
- 河本 宏：iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生 Tsukuba Hematologic Disease Seminar (2013.10.18. 筑波)
- 河本 宏：iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生 血液事業学会 (2013.10.21. 札幌)
- 河本 宏：Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology World Conference on Regenerative Medicine Keynote Lecture in Workshop (2013.10.23. Leipzig)
- 河本 宏：iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生 広島大学原爆放射線医科学研究所セミナー (2013.11.7. 広島)
- 河本 宏：Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology Taiwan – Japan Meeting for Potential Collaboration (2013.11.8. 京都)
- 河本 宏：Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology Synthetic Immunology meeting (2013.11.15. 京都)
- 河本 宏：T 細胞のルーツ探し 再生研－ウイルス研合同セミナー (2013.11.18. 京都)
- 河本 宏：Reprogramming of T cells as a novel method of cloning and expansion of antigen specific T cells 日本免疫学会シンポジウム (2013.12.11. 幕張)
- 増田喬子：iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生 －がんの免疫療法を革新する可能性－血液科学セミナー (2013.11.10. 東京)
- 増田喬子：T 細胞を支えるストローマ細胞：その発生から臨床応用まで 京滋免疫血液勉強会 (2013.12.19. 京都)

# 再生医学応用研究部門

## 生体修復応用分野 Department of Biological Repair

分野主任 教授 高橋 淳

*Prof. Jun Takahashi*

### 【研究概要】

我々は、胚性幹細胞(ES細胞)と人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた神経難病治療法開発を目指している。なかでも、胎児黒質細胞移植によって臨床経験が蓄積されているパーキンソン病を主な対象疾患として、ドパミン神経細胞の誘導、細胞移植による神経症状の改善に関する研究を行っている。この細胞移植療法においては、効率的な神経誘導、腫瘍形成抑制のための細胞選別、移植細胞の生存維持、長期効果と安全性の確認など検討すべき点が多々あり、現在はこれらをひとつひとつ解決している。将来的には、細胞移植や脳深部刺激療法などを含めた総合的な神経難病治療に繋げたいと考えている。

2013年は、霊長類を用いて自家・他家移植の直接比較を行った(図1)。カニクイザルの皮膚線維芽細胞あるいは血液細胞からiPS細胞を樹立し、さらにドパミン神経細胞を誘導。自分の脳に移植する自家移植とMHCが全く異なる別の個体に移植する他家移植とを同時に行い、免疫抑制剤を用いずに3か月間経過観察した。4ペアで繰り返し行ったところ、自家移植では免疫反応はほとんどみられず、ドパミン神経細胞の生着は良好であった。一方、他家移植ではマイクログリアの活性化やリンパ球の集積などの免疫反応が認められた。ただし、移植細胞はすべて拒絶されたわけではなく、自家移植の半分程度のドパミン神経細胞生着がみられた。これらの結果は、iPS細胞を用いた神経細胞の自家移植では免疫抑制剤を用いなくても良好な細胞生着が得られることを示唆する。また、中枢神経系は免疫学的租界と言われもともと免疫反応が弱い場所とされており、今回の結果から移植後の免疫抑制を上手にコントロールしたり、MHC適合移植を行ったりすることによって、他家移植でも効果的な移植が行えると予想される。

また、我々は細胞移植後のホスト脳環境にも注目しており、特に臨床応用を視野に入れて、臨床ですでに使用されている薬剤の中でドパミン神経細胞の生着を向上させる薬剤を検索した。マウスES細胞由来ドパミン神経前駆細胞をマウス線条体に移植し、同時にバルプロ酸、ゾニサミド、エストロゲンを全身投与したところ、バルプロ酸とゾニサミドを投与した際に中脳ドパミン神経細胞の生着が有意に増加することが明らかとなった(図2)。現在はヒトiPS細胞に対するこれらの薬剤の影響を調べている。

We are developing a cell replacement therapy for the neurological disorders by using stem cells, especially embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs). The main target is Parkinson's disease, and our research focuses on induction of dopaminergic (DA) neurons from these cells and transplantation of the cells into the brain to improve neurological symptoms. So far, we have demonstrated that transplantation of monkey ESC-derived neurons improved the Parkinsonian symptoms of the monkey models. In addition, we have revealed a method to prevent tumor formation. Now, we are inducing DA neurons from human ESCs and iPSCs, and develop-

ing a safe and efficient method for clinical application of these cells.

In 2013, we have reported the results of direct comparison of the autologous and the allogeneic transplantation in the brains of non-human primates. We demonstrated that the autologous transplantation of iPSC-derived neurons elicited only a minimal immune response in the brain. In contrast, the allografts caused an acquired immune response with the activation of microglia (IBA-1<sup>+</sup>/MHC-class2<sup>+</sup>) and the infiltration of leukocytes (CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>). Consequently, a higher number of dopaminergic neurons survived in the autografts. Our results suggest that the autologous transplantation of iPSC-derived neural cells is beneficial for minimizing the immune response in the brain compared to allogeneic grafts.

We have also attempted to modify the host environment and investigated whether the simultaneous administration of soluble factors can improve the survival and differentiation of murine iPSC-derived DA neurons in host

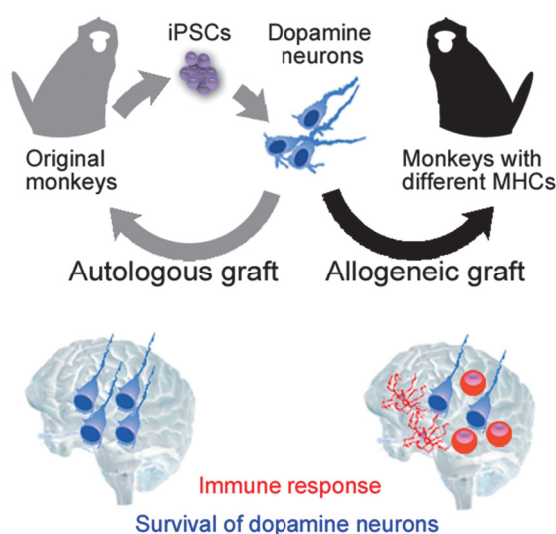


図1 カニクイザル iPSC 細胞由来ドパミン神経細胞の自家・他家移植直接比較  
自家移植では免疫抑制なしでも免疫反応は起こらずドパミン神経細胞の生着は良好であった。他家移植では免疫反応が認められたが、すべての細胞が拒絶されるほど強いものではなかった。

**Fig. 1 Direct comparison of the autologous and the allogeneic transplantation of iPSC-derived neurons in primates.**  
The autologous transplantation of iPSC-derived neurons elicited only a minimal immune response in the brain. In contrast, the allografts caused an acquired immune response with the activation of microglia (IBA-1<sup>+</sup>/MHC-class2<sup>+</sup>) and the infiltration of lymphocytes (CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>).

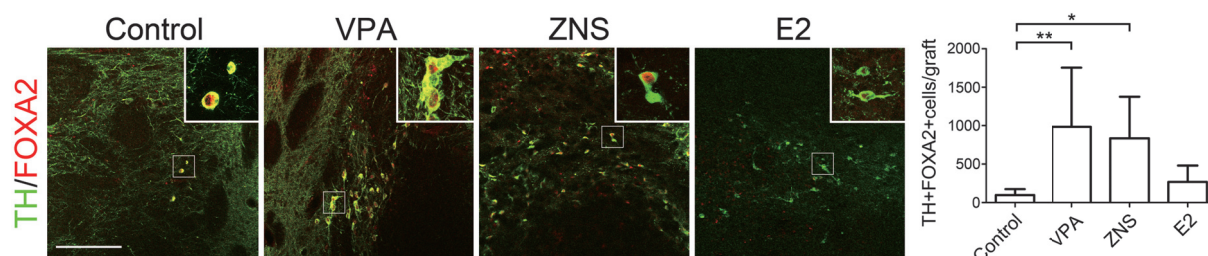


図2 バルプロ酸、ゾニサミド、エストロゲン投与後のドパミン神経細胞生着比較  
写真は移植4週後の移植片の免疫細胞。TH(緑)はドパミン神経細胞マーカー。FOXA2(赤)は複側中脳マーカー。二重陽性細胞は中脳ドパミン神経細胞。グラフは移植片あたりの中脳ドパミン神経細胞数を示す。

**Fig. 2 Analyses of iPSC-derived midbrain DA neurons in animals treated with VPA, ZNS or E2.**  
Representative immunohistologic images of grafts containing midbrain DA neurons (TH=DA neuron marker, green ; FOXA2=ventral-midbrain marker, red). The scale bar applies to all pictures and represents 50  $\mu$ m. A graph shows a comparison between each group for the number of FOXA2<sup>+</sup>TH<sup>+</sup> cells(midbrain DA neurons)per graft. The data are presented as the mean  $\pm$  SD. (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 ; n=8 control, n=6 VPA, ZNS, E2)



brains. With the goal of applying this technology in clinical settings in the near future, we selected drugs that were already approved for clinical use. The drugs included two commonly used anticonvulsants, valproic acid (VPA) and zonisamide (ZNS), and estradiol (E2), also known as biologically active estrogen. Immunofluorescence studies revealed that VPA and ZNS increased the number of TH<sup>+</sup>FOXA2<sup>+</sup> midbrain DA neurons, suggesting that the systemic administration of VPA and ZNS may improve the efficiency of cell replacement therapy using iPSCs to treat PD.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Morizane A, Doi D, Takahashi J.: Neural induction with a dopaminergic phenotype from human pluripotent stem cells through a feeder-free floating aggregation culture. *Methods Mol Biol* **1018**: 11-19(2013)

Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, Hotta A, Kawasaki T, Hayashi T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J.: Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a nonhuman primate. *Stem Cell Reports* **1**(4): 283-292(2013).

Nishimura K, Takahashi J.: Therapeutic application of stem cell technology toward the treatment of Parkinson's disease. *Biol Pharm Bull* **36**(2) 171-175(2013)

Nishimura K, Kitamura Y, Agata K, Takahashi J.: A Survey of the molecular basis for the generation of functional dopaminergic neurons from pluripotent stem cells: Insights from regenerative biology and regenerative medicine. In: *Neural Stem Cells - New Perspectives*. Edited by Luca Bonfanti, Rijeka, Croatia: InTech. pp 271-286(2013)

Koyanagi-Aoi M, Ohnuki M, Takahashi K, Okita K, Noma H, Sawamura Y, Teramoto I, Narita M, Sato Y, Ichisaka T, Amano N, Watanabe A, Morizane A, Yamada Y, Sato T, Takahashi J, Yamanaka S.: Differentiation defective phenotypes revealed by large scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**(51): 20569-20574(2013).

Yoshikawa T, Samata B, Ogura A, Miyamoto S, Takahashi J. Systemic administration of valproic acid and zonisamide promotes differentiation of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons. *Front Cell Neurosci*. published online.(2013)

Ogura A, Morizane A, Nakajima Y, Miyamoto S, Takahashi J.:  $\gamma$ -Secretase inhibitors prevent overgrowth of transplanted neural progenitors derived from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. **22**(3): 374-382(2013)

#### 2) 著 書

菊地 哲広, 高橋 淳: 第3章 再生医療 iPS細胞(パーキンソン病)「先進医療 NAVIGATOR」(奥村 康・中島正治・大坪 修監修, 日本医学出版, 東京)96-98(2013)

### 3) 総 説

森実飛鳥, 高橋 淳: パーキンソン病に対する幹細胞移植治療の実現化, 炎症と免疫 **vol.21**(2), 36-40, 2013

土井大輔, 高橋 淳: iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療の開発 BIO Clinica **28**(13): 23-27, 2013

西村周泰, 高橋 淳: パーキンソン病に対する幹細胞を用いた再生医療アプローチファルマシア, **49**(9): 873-877, 2013

元野 誠, 高橋 淳: パーキンソン病の再生医療医学のあゆみ **247**(10): 1103-1108, 2013

---

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

Takahashi J. Challenges towards stem cell therapy for Parkinson's disease. Chulalongkorn University 5th Annual Meeting on Stem Cells (2013.1.28. Bangkok, Thailand)

Takahashi J. ES/iPS cell therapy for Parkinson's disease Eureka! Discoveries in Stem Cells symposium (2013.2.1. Melbourne, Australia)

Takahashi J. Challenges towards stem cell therapy for Parkinson's disease Australian Neuroscience Society 33rd Annual Meeting (2013.2.4. Melbourne, Australia)

Takahashi J. Isolation of iPSC-derived dopaminergic progenitor cells. CIRM/NIH Parkinson's Disease Workshop in California (2013.3.21. California, USA)

高橋 淳: 再生医学・再生医療の最前線第 110 回日本内科学会講演会(2013.4.12. 東京)

高橋 淳: iPS 細胞を用いたパーキンソン病の再生医療第 54 回日本神経学会学術大会(2013.5.29. 東京)

Takahashi J: Induced pluripotent stem cells for Parkinson's disease: Past, present and future. 17th International Congress of Parkinson Disease and Movement Disorders(2013.6.20. Sydney, Australia)

Takahashi J: Challenges towards stem cell therapy for Parkinson's disease. Neuro 2013(2013.6.22. Kyoto)

高橋 淳: ES, iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 34 回日本炎症・再生医学会(2013.7.3. 京都)

高橋 淳: iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 3 回西播磨ブレインサイエンス研究会(2013.8.31. たつの市)

Takahashi J: Stem Cell Research and Application in Neurodegenerative Diseases The 1st National Conference of Neuroscience Indonesia 2013(2013.9.14. Jakarta, Indonesia)

高橋 淳: iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 41 回日本磁気共鳴医学会大会(2013.9.20. 徳島)

高橋 淳: iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 日本脳神経外科学会 第 72 回学術総会(2013.10.16. 横浜)

高橋 淳: iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 16 回北海道臨床神経学研究会(2013.11.2. 札幌)

高橋 淳: 霊長類モデルを用いたパーキンソン病に対する iPS 細胞移植治療開発 日本人類遺伝学会 第 58 回大会(2013.11.22. 仙台)

Takahashi J: Stem cell therapy for Parkinson's disease 2013 World Stem Cell Summit(2013.12.3. San Diego, USA)

森実飛鳥, 土井大輔, 菊地哲広, 沖田圭介, 川崎俊之, 尾上浩隆, 田中景子, 椎名 隆, 高橋 淳: iPS 細胞を用いた自家移植の有効性~カニクイザル脳内神経細胞移植の系を用いて 第 12 回日本再生医療学会総会(2013.3.22. 横浜)

Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, Hotta A, Kawasaki T, Onoe H, Shiina T, Takahashi J: Autologous Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons Causes Minimum Immune Reaction in the

Brain of Non-Human Primate. ISSCR 11th Annual Meeting(2013.6.13. Boston, USA)

森実飛鳥：iPS細胞由来ドーパミン神経の自家および同種移植による脳内免疫応答 日本脳神経外科学会 第72回学術総会(2013.10.16. 横浜)

Doi D, Morizane A, Takahashi J: Sorting and Transplantation of Dopaminergic Progenitor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. ISSCR 11th Annual Meeting(2013.6.13. Boston, USA)

土井大輔, 高橋 淳：表面抗原を用いたヒト ES/iPS細胞由来ドーパミン神経前駆細胞のソーティング 第23回日本サイトメトリー学会学術集会(2013.6.23. 東京)

土井大輔：ヒト iPS細胞由来ドーパミン神経前駆細胞の脳内移植 日本脳神経外科学会 第72回学術総会(2013.10.16. 横浜)

Nishimura K, Takahashi J. Isolation of the new secreted factors for maturation/differentiation of grafted iPSC-derived dopaminergic neurons.

The 2nd CiRA Retreat, (2013.3.13. Shiga)

Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Okita K, Inoue H, Takahashi J: Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Idiopathic Parkinson's Disease Patients Differentiate into Midbrain Dopaminergic Neurons. ISSCR 11th Annual Meeting(2013.6.13. Boston, USA)

菊地哲広：パーキンソン病患者由来人工多能性幹細胞からのドーパミン神経誘導 日本脳神経外科学会 第72回学術総会(2013.10.16. 横浜)

## 2) 講演・シンポジウム

高橋 淳：パーキンソン病に対する幹細胞移植治療の実現化 再生医療の実現化ハイウェイ平成24年度成果報告会(2013.2.7. 東京)

高橋 淳：パーキンソン病に対するドーパミン神経細胞移植 国立医薬品食品衛生研究所公開シンポジウム「ヒト iPS細胞由来分化細胞の実現化」(2013.2.14. 東京)

高橋 淳：パーキンソン病に対する幹細胞移植の開発研究 医工学フォーラム 2012年度特別学術講演会(2013.2.27. 京都)

高橋 淳：iPS細胞の臨床応用 京都市立病院協会 臨床検査部会講演会(2013.2.28. 京都)

高橋 淳：パーキンソン病に対する iPS細胞由来ドーパミン神経細胞移植 国立精神・神経医療研究センターセミナー(2013.3.29. 東京)

高橋 淳：パーキンソン病に対する細胞移植治療 埼玉県パーキンソン病友の会 医療講演会(2013.5.26. 埼玉)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病の細胞移植治療 第39回神戸薬科大学卒後研修講座(2013.6.2. 神戸)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 第144回日本医学会シンポジウム 臨床応用をめざした iPS細胞研究(2013.6.6. 東京)

高橋 淳：ES, iPS細胞を用いた パーキンソン病治療 一般社団法人 全国パーキンソン病友の会福岡県支部 創立30周年記念大会(2013.6.9. 福岡)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病の再生医療 第19回城東地区泌尿器科専門医会(2013.6.28. 東京)

高橋 淳：ES, iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 平成25年度 弁理士の日記念講演会(2013.6.29. 大阪)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 平成25年度芝蘭会三重支部総会(2013.7.14. 三重)

高橋 淳：パーキンソン病, 脳血管障害に対する iPS細胞由来神経細胞移植による機能再生治療法の開発 再生医

療実現拠点ネットワークプログラム キックオフシンポジウム(2013.8.26. 東京)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 第16回 Osaka Neurology Forum 特別講演(2013.8.29. 大阪)

高橋 淳：パーキンソン病、脳血管障害に対するiPS細胞由来神経細胞移植による機能再生治療法の開発 再生医療実現拠点ネットワークプログラム ワークショップ(2013.9.3. 浜松)

高橋 淳：パーキンソン病に対する細胞移植治療 専門家と直接意見交換シンポジウム in KRP Part VI(2013.9.18. 京都)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 第8回 iPS細胞実用化勉強会(2013.9.27. 京都)

高橋 淳：メッセージ 2013 Neurosurgery Career Development Forum(2013.10.12. 大阪)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 第14回東海パーキンソン病治療・症例検討会(2013.10.18. 名古屋)

高橋 淳：iPS細胞によるパーキンソン病治療の試み 新潟医学会例会 シンポジウム(2013.10.19. 新潟)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 NPO 法人 大阪難病連「秋の学習講演会と難病医療相談会」講演会の部(2013.10.27. 大阪)

高橋 淳：再生医療って何? ～再生医療の方法論～ JST 広報カフェ(2013.10.30. 東京)

高橋 淳：パーキンソン病に対するiPS細胞移植治療の現状と展望 第26回症例検討会・講演会(2013.10.31. 京都)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 全国パーキンソン病友の会北海道支部 医療講演(2013.11.3. 札幌)

Takahashi J: A Challenge towards stem cell therapy for Parkinson's disease Taiwan-Japan Meeting for Potential Collaboration(2013.11.8. Kyoto)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病の治療 平成26年度広報・保険事業説明会(2013.11.11. 大阪)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 日本再生医療学会エデュケーショナルセミナー(2013.11.12. 東京)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療の開発研究 高知パーキンソン病フォーラム(2013.11.16. 高知)

Morizane A.: Topics from the FIRST Program CiRA International Symposium 2013(2013.3.12. Kyoto)

Morizane A: Transplantation of autologous neural cells derived from induced pluripotent stem cells(iPSCs) to the brain of non-human primate 2013 CABX Workshop and International Symposium(2013.12.9. Jeju, Korea)

土井大輔：パーキンソン病に対するiPS細胞を用いた細胞移植治療 第7回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres(2013.10.12. 東京)

## 組織再生応用分野 Department of Tissue Regeneration

分野主任 教授 戸口田 淳也

*Prof. Junya Toguchida*

### 【研究概要】

本研究分野の目標は間葉系組織の増殖分化機構を理解することで、間葉系組織の臨床病態を分子レベルで明らかにし、それに基づいて新規の治療法を開発することである。以下のテーマについて現在研究を遂行している。

#### 1. 間葉系幹細胞に関する研究

##### 1) 増殖及び分化制御機構の解明

骨髄間質細胞中には、間葉系組織の様々な細胞に分化可能な組織幹細胞である間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell, MSC)が存在しているとされている。しかし MSC の本態に関しては未解明な点が多く、MSC を用いた間葉系組織の再生医療を科学的根拠に基づいた医療とするためには、その理解が必須である。我々は京都大学医学部整形外科教室との共同研究として、MSC の初代培養を行い、増殖及び分化能に関する解析を行ってきた。増殖制御機構に関しては、細胞周期制御因子である p16 遺伝子の発現亢進が細胞老化を誘導し、増殖停止をもたらす主因であることを報告した。続いて低酸素環境での培養により、p16 遺伝子の発現亢進が阻害でき、細胞老化に至ることなく、かつ分化能を維持したまま長期間増殖を継続できること、更に低酸素により ERK の活性が阻害され、それが p16 遺伝子の発現亢進阻害の一因であることを見出した。現在、培地成分の影響を解析している。

##### 2) 再生医療への応用

MSC を用いた再生医療の実践として、骨壊死病変に対する細胞移植治療法の開発に取り組んでいる。イヌを用いた基礎実験のデータに基づき、京都大学医学部附属病院内の分子細胞治療センターを使用する臨床治験を「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に基づいた臨床研究として京都大学医学部医の倫理委員会及び厚生労働大臣諮問委員会に申請し、平成 19 年 11 月 25 日国内初の承認を受けた。平成 20 年 2 月 5 日に第一例の治療を開始し、平成 21 年 12 月末までに 15 例の治療を施行した。大腿骨頭壊死症例 10 例に関しては全例術後 2 年経過時点の評価が終了し、良好な成績が得られており、その結果に基づいて、先進医療への申請を計画している。

#### 2. 多能性幹細胞を用いた間葉系組織の研究

平成 19 年 11 月に山中伸弥教授らによって樹立されたヒト iPS 細胞は、無限の増殖能を有する多能性幹細胞であり様々な医学・医療応用が探索されている。我々は京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)の一員として、iPS 細胞から誘導した間葉系細胞に関する研究を行っている。これまでに iPS 細胞のクローン間での間葉系への分化能の相違は、由来する組織に依存するのではなく、ドナー間での相違による事を明らかにした。現在は下記の研究を行っている。

##### 1) 肉腫起源細胞の探索

肉腫とは間葉系組織に発生する悪性腫瘍であり、臨床及び病理学的に極めて多様な腫瘍の集団である。近年の遺



伝子解析技術の進歩により、それぞれの腫瘍において腫瘍発生に関連する遺伝子異常が明らかにされてきているが、起源細胞に関しては、その多くにおいて不明である。同一の遺伝子変異を有している腫瘍でも、それぞれの増殖を規定するシグナル伝達系や分化能が異なることが明らかにされつつあり、これらは細胞起源の相違に起因している可能性が伺える。我々は腫瘍特異的な遺伝子変異が薬剤誘導型発現ベクターを用いて導入された多能性幹細胞を用いて細胞起源を解明し、個々の腫瘍の多様性の成因を明らかにすることで、個別化治療の開発に寄与する情報を得ることを目指している(図1)。現在、S18-SSX という腫瘍特異的な融合遺伝子をもつ滑膜肉腫に対する研究を展開している(図2)。

## 2) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と創薬

遺伝性の筋骨格系疾患の多くは、病態が不明で有効な治療法が確立されていない。特定の個人から樹立できるという iPS 細胞の特質を利用して、近年、疾患罹患者由来の iPS 細胞を樹立して病態解明から創薬に向けた研究が展開されている。我々も現在、複数の難治性骨軟骨疾患に対して、疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究を行っている。

## 3) iPS 細胞由来分化間葉系細胞を用いた再生医療

iPS 細胞由来の分化細胞を用いた再生医療に関しては、iPS 細胞研究所の妻木研究室との共同研究として軟骨病態に対する細胞治療の開発を目指している。

## 3. 細胞を用いない再生医療に関する研究

上記の細胞を用いた再生医療と同時に、薬剤等による *in situ* での組織再生の探求も重要な課題である。我々は生理活性物質であるプロスタノイドに注目し、その受容体特異的作動薬の応用を検討してきた。プロスタグランディン E2 受容体の中の EP2 受容体に特異的に作用するアゴニストにより、軟骨細胞の増殖が促進されることを報告し、

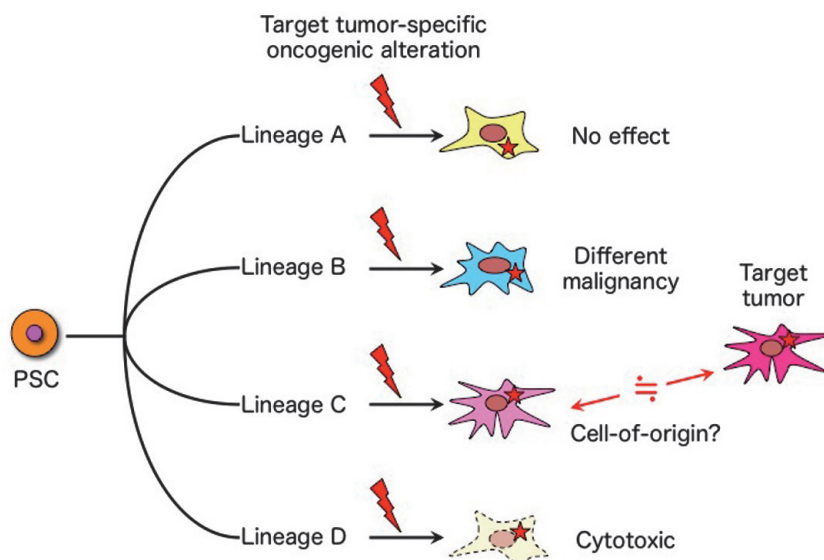


図1 多能性幹細胞を用いた腫瘍起源細胞の探索。多能性幹細胞(PSC)を各細胞系譜に分化誘導を行い、それぞれにおいて標的とする腫瘍に特異的な変異を導入する。導入細胞の遺伝子発現や表現型を標的腫瘍のものと比較し、起源細胞を探索する。

**Figure 1** Investigation for cell-of-origin of sarcomas using pluripotent stem cells. Tumor specific oncogenic alterations are introduced into pluripotent stem cells (PSC) after the differentiation into each cell lineage, and the genotype and phenotype of introduced cells are compared with those of target tumor cells.

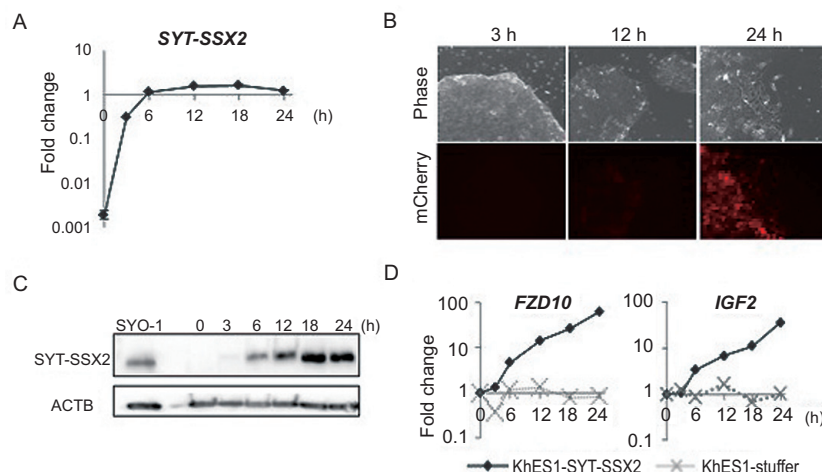


図2 滑膜肉腫研究に対する応用. 滑膜肉腫特異的な融合遺伝子である SS18-SSX 遺伝子を, 薬剤誘導型発現ベクターを用いて多能性幹細胞に導入した. 薬剤添加により融合遺伝子の発現が誘導され (A, mRNA ; B, タンパク質), 発現細胞 (mCherry 陽性細胞) がコロニーより遊走することが確認された. 更に下流遺伝子である FZD10 や IGF2 の発現が誘導された (D).

**Figure 2** Application for the research of synovial sarcoma (SS). SS-specific fusion oncogene, SS18-SSX, was incorporated into the drug-inducible expression vector and introduced into PSCs. By the treatment with the drug, SS18-SSX was induced at mRNA (A) and protein (B) level, and cells expressing SS18-SSX (labeled red by mCherry in C) started to migrate from colonies. The expression of down-stream genes was also induced (D).

この知見に基づいて家兎を用いた *in vivo* 治療実験を行った. まず骨軟骨欠損を作成し, 修復過程に対する EP2 アゴニストの作用を検討した. その結果, 関節軟骨の修復が促進され, かつ正常な骨軟骨境界構造が構築され, 長期に渡り関節構造が維持されることを見出した. 続いて前十字靱帯切離及び内側半月板部分切除による外傷変性モデルを作成し, 直後より EP2 アゴニストを投与し, 投与量依存性に変性が軽減されることが判明した. 免疫組織学的解析及び *in vitro* 培養系での実験結果より, この変性予防作用は MMP-13 産生の抑制を介した作用であると想定された. これらの結果に基づき, 現在 Drug Delivery System を, 繰返し投与が可能となるように改変し, 外傷性モデルによる解析を行っている. (文責 戸口田淳也)

The objectives of our department are to disclose the pathology of disorders in mesenchymal tissues at the molecular level and to develop new therapeutic modalities by understanding physiological growth and differentiation of mesenchymal cells. Following projects are currently undertaken.

## 1. Researches on mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells (MSC), which exist in bone marrow stromal tissues, have a potential to differentiate to cells of various types in mesenchymal tissues. We have been working on following issues related to MSCs.

### 1) Regulation of growth and differentiation potential of mesenchymal stem cells

Many fundamental features of MSCs are still unknown, which are crucial for the development of regeneration therapy using MSC as the evidence based medicine. In collaboration with the Department of Orthopaedic Surgery in Kyoto University Hospital, we have analyzed the growth and differentiation potential of primary human MSCs. As for the growth regulation, we found that increased expression of the p16 gene, which is a key regulator of cell cycle, was the main cause inducing the senescence and growth arrest of MSC. We also found that the hypoxic cul-

ture condition inhibited the upregulation of the p16 gene, and retained MSCs in the senescence-free state with multidirectional differentiation properties. We also found that hypoxia down-regulated the activity of ERK, which, at least in part, involved in the down-regulation of the p16 gene. We are currently investigating the effects of nutrients in the culture media.

## **2) Clinical trial of the new treatment for osteonecrosis using MSC**

As the clinical application of MSC, we have engaged in the development of cell transplantation therapy for osteonecrosis. Based on the results obtained by the animal experiments using dogs, we established the protocol for the clinical trial in collaboration with Center for Cellular and Molecular Therapy in Kyoto University Hospital, which followed the guideline for the clinical trial using somatic stem cells issued by the the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW). After the examination of ethical committee of Kyoto University and MHLW, our protocol was approved on November 25, 2007, and the first case was registered on November 31, 2007. Since then 15 cases have been treated until the end of December 2010. All of 10 cases of femoral head necrosis were followed at least 24 months, showing satisfactory results. Based on the data of this intermediate evaluation, we are going to submit this method as an advanced therapy for MHLW.

## **2. Researches on pluripotent stem cells**

Human iPS cells, which were established by Prof. Shinya Yamanaka on November 2007, are pluripotent stem cells with unlimited growth potential, and promising materials to apply for a variety of medical fields. We have been engaging the research related to iPS cells as members in the Center for iPS Research and Application, Kyoto University. So far we found that the clonal difference of iPS cells were derived from the difference donor using genetically matched iPS cells established from different tissues of same donors. Followings are current on-going projects.

### **1) Investigation for the cell-of-origin in sarcomas using pluripotent stem cells**

Sarcomas are malignant tumors developed in mesenchymal tissues and consisted of tumors with a A number of recent reports suggest that cancer cells are derived from stem cells in each tissue. Therefore MSC can be cell-of-origin of sarcomas, which are malignant tumors developing in mesenchymal tissues. Also MSC can be tumor-initiating cells of sarcomas, which are highly tumorigenic and resistant to chemotherapeutic drugs. In other words, markers for sarcoma initiating cells can be used to identify MSC among stromal cells. We are currently focusing of p75 NGFR, which is expressed on both MSC and osteosarcoma, a representative sarcoma derived from bone marrow stromal cells.

### **2) Approaches for intractable musculoskeletal diseases using disease-specific iPS cells**

In most of cases, the pathophysiology in hereditary musculoskeletal diseases are still to be investigated and no effective treatments are available. Using the advantage that iPS cells can be established from particular individuals, a number of disease-specific iPS cells have been established and used to understand the disease and discover the drugs. We are also employing this approach for several intractable bone and cartilage diseases.

### 3) Regenerative medicine using iPS cell-derived mesenchymal cells

Cell therapy using iPS cell-derived differentiated cells is one of the important applications of iPS cells, and we are aiming to develop cell therapy for cartilage diseases in collaboration with Prof. Tsumaki in CiRA.

### 4. Application of agonist for the PGE2 receptors for the articular cartilage repair

In addition to the development of cell therapy, it is also important to develop the *in situ* treatment using drugs or small molecular materials. We have focused on prostanoids, which belong to physiological active materials, and applied receptor agonists for the regeneration therapy. First we focused on EP2, which is one of four types of prostaglandin E2 receptor, and reported that the agonist specific to EP2 stimulated the growth of mouse and human chondrocytes extracted from articular cartilage. Based on these results, we have performed the *in vivo* experiments using rabbits. At first, we created the osteochondral defects and investigated the effect of EP2 agonist for tissue regeneration. As a result, in combination with appropriate drug carriers, EP2 agonist enhanced the cartilage regeneration *in vivo*, and contributed to reconstruct the osteo-chondral boundary, which is important factor to maintain normal structure of articular cartilage. Next, we created traumatic degeneration model by the dissection of anterior cruciate ligament and partial resection of medial meniscus and found that administration of EP2 agonist prevented the degeneration of articular cartilage dose-dependently. Immunohistochemical analyses and *in vitro* experiments suggested that the preventive effect of EP2 agonist is through the inhibition of MMP-13 expression, which is one of major protease to break cartilage matrix. Based on these results, we created new drug delivery system which allows repetitious administration and now are investigating the effect for traumatic degeneration model. Preliminary results suggested that this receptor-specific agonist is a promising molecule for clinical application.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Kajita Y, Kato T Jr, Tamaki S, Furu M, Takahashi R, Nagayama S, Aoyama T, Nishiyama H, Nakamura E, Katagiri T, Nakamura Y, Ogawa O, Toguchida J. The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1). *PLoS One*, 2013 ; 8(1): e49709.
- Yamada K, Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida T, Shimizu K, Hara A, Yamada Y. EWS/ATF1 expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. *J Clin Invest*. 2013 ; 123(2): 600-10.
- Hayakawa K, Ikeya M, Fukuta M, Woltjen K, Tamaki S, Takahara N, Kato T Jr, Sato S, Otsuka T, Toguchida J. Identification of target genes of synovial sarcoma-associated fusion oncoprotein using human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 ; 432(4): 713-9.
- Nasu A, Ikeya M, Yamamoto T, Watanabe A, Jin Y, Matsumoto Y, Hayakawa K, Amano N, Sato S, Osafune K, Aoyama T, Nakamura T, Kato T, Toguchida J. Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. *PLoS One*. 2013 ; 8(1): e53771.

- Okita Y, Tatematsu N, Nagai K, Nakayama T, Nakamata T, Okamoto T, Toguchida J, Ichihashi N, Tsuboyama T. Characteristics of flexed knee gait and functional outcome of a patient who underwent knee reconstruction with a hingeless prosthesis for bone tumor resection: a case report with gait analysis and comparison with healthy subjects. Eur J Phys Rehabil Med. 2013 Jul 9. [Epub ahead of print]
- Okita Y, Tatematsu N, Nagai K, Nakayama T, Nakamata T, Okamoto T, Toguchida J, Matsuda S, Ichihashi N, Tsuboyama T. Compensation by nonoperated joints in the lower limbs during walking after endoprosthetic knee replacement following bone tumor resection. Clin Biomech (Bristol, Avon). 2013; 28(8): 898-903.
- Matsumoto Y, Hayashi Y, Schlieve CR, Ikeya M, Kim H, Nguyen TD, Sami S, Baba S, Barruet E, Nasu A, Asaka I, Otsuka T, Yamanaka S, Conklin BR, Toguchida J, Hsiao EC. Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation. Orphanet J Rare Dis. 2013; 8(1): 190.
- 戸口田淳也. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた難治性骨・軟骨疾患の病態解析. Bio Clinica 2013; 28(3): 37-41.
- 渡辺 真, 横山宏司, 佐藤孝明, 戸口田淳也. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝性軟骨疾患マーカー探索(解説). Medical Science Digest 2013; 39(11): 530-533.
- 渡邊 睦, 仲俣岳晴, 岡本 健, 松田秀一, 戸口田淳也. 骨巨細胞腫多発肺転移に denosumab が有効であった 1 例. 中部整災誌 2013; 56(3): 767.
- 松本佳久, 福田 誠, 池谷 真, 戸口田淳也. iPS 細胞の基礎と応用(第 3 回)iPS 細胞を使うー骨の研究へ. 整形外科 2013; 64(9): 1017-1019.

---

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 横山宏司, 池谷 真, 那須 輝, 田中孝之, 斎藤 潤, 梅田雄嗣, 西小森隆太, 中畑龍俊, 平家俊男, 戸口田淳也. 罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明. 第 12 回日本再生医療学会(2013.3.21. 横浜)
- 松本佳久, 池谷 真, Edward Hsiao, 那須 輝, 浅香 勲, 大塚隆信, 戸口田淳也. 人工多能性幹細胞を用いた希少難治性骨疾患への取り組み. 第 12 回日本再生医療学会(2013.3.22. 横浜)
- 光澤定己, 岡本 健, 仲俣岳晴, 松田秀一, 戸口田淳也. 自家処理骨を用いた臼蓋部悪性骨腫瘍切除後の再建. 第 120 回中部日本整形外科災害外科学会(2013.4.6. 和歌山)
- 岡本 健, 中山富貴, 仲俣岳晴, 松田秀一, 戸口田淳也. 当科における脊椎原発性悪性骨腫瘍の治療成績. 第 42 回日本脊椎脊髄病学会(2013.4.25 那覇)
- 平賀博明, 田仲和宏, 比留間徹, 中馬広一, 尾崎敏文, 荒木信人, 井須和男, 戸口田淳也, 森岡秀夫, 福田治彦, 岩本幸英. JCOG プロジェクトから見た化学療法の展望. 第 86 回日本整形外科学会学術総会(2013.5.23 広島)
- 岡本 健, 仲俣岳晴, 中山富貴, 坪山直生, 戸口田淳也, 松田秀一. 上腕骨悪性骨腫瘍切除後の処理骨再建の長期成績. 第 86 回日本整形外科学会学術総会(2013.5.25 広島)
- Fukuta M, Jin Y, Hayakawa K, Kobayashi K, Matsumoto Y, Hineno S, Maruyama T, Ochi Y, Otsuka T, Toguchida J. Therapeutic application of EP2 agonist for cartilage regeneration. 研究所ネットワーク国際シンポジウム(2013.6.27 京都)



横山宏司, 西小森隆太, 池谷 真, 那須 輝, 田中孝之, 斎藤 潤, 梅田雄嗣, 中畑龍俊, 戸口田淳也, 平家俊男.  
罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明. 第 34 回日本再生・炎症  
学会(2013.7.3 京都)

早川和男, 池谷 真, 福田 誠, Knut Woltjen, 玉置さくら, 高原直子, 松本佳久, 佐藤信吾, 大塚隆信, 戸口  
田淳也. 多能性幹細胞を用いた融合遺伝子標的遺伝子の同定. 第 46 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集  
会(2013.7.11 東京)

玉置さくら, 加藤友久, 早川和男, 福田 誠, 高原直子, 戸口田淳也. SYT-SSX による滑膜肉腫関連遺伝子 FZD  
10 のエピジェネティック制御機構について. 第 46 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2013.7.11 東京)

沖田祐介, 立松典篤, 永井宏達, 仲俣岳晴, 岡本 健, 戸口田淳也, 健内宏重, 市橋則明, 松田秀一, 坪山直生.  
大腿軟部肉腫広範切除後長期経過例における歩行動態と残存筋活動度の検討. 第 46 回日本整形外科学会骨  
軟部腫瘍学術集会(2013.7.12 東京)

岡本 健, 仲俣岳晴, 松田秀一, 戸口田淳也. 当科における脊椎原発悪性骨腫瘍の治療成績. 第 46 回日本整形外  
科学会骨軟部腫瘍学術集会(2013.7.12. 東京)

福田 誠, 金 永輝, 松本佳久, 日根野翔, 関口和也, 丸山隆幸, 越智保夫, 大塚隆信, 戸口田淳也. 軟骨病態治  
療薬としての EP2 受容体特異的作動薬: 変形性関節症モデルを用いて. 第 32 回日本運動器移植・再生医学  
研究会(2013.9.28. 神戸)

金 永輝, Hassan Elalaf, 加藤友久, 池谷真, 永田早苗, 仲俣岳晴, 岡本 健, 松田秀一, 戸口田淳也. 日本人の  
軟骨腫瘍における IDG 遺伝子の突然変異スペクトラム. 第 72 回日本癌学会総会(2013.10.3. 横浜)

長山 聡, 高橋 亮, 井元清哉, 布留守敏, 梶田洋一郎, 片桐豊雅, 中村祐輔, 坂井義治, 戸口田淳也. 細胞骨格  
関連タンパク C7059 は細胞遊走能を制御して大腸癌進展に関与する. 第 72 回日本癌学会総会(2013.10.4.  
横浜)

福田 誠, 早川和男, 玉置さくら, 加藤友久, 池谷 真, 岡本 健, 大塚隆信, Knut Woltjen, 戸口田淳也. iPS  
細胞技術を用いた肉腫研究: 滑膜肉腫の起源細胞解明を目指して. 第 72 回日本癌学会総会(2013.10.4. 横浜)

加藤友久, 玉置さくら, 早川和男, 福田 誠, 岡本 健, 戸口田淳也. 滑膜肉腫原因融合遺伝子産物 SS18-SSX  
の相互作用因子の同定によるエピジェネティクス制御破綻の分子基盤の解明. 第 72 回日本癌学会総会  
(2013.10.4. 横浜)

玉置さくら, 加藤友久, 早川和男, 福田 誠, 高原直子, 岡本 健, 戸口田淳也. 細胞背景は滑膜肉腫特異的融合  
タンパク SYT-SSX はエピジェネティック制御において重要な因子である. 第 72 回日本癌学会総会  
(2013.10.4. 横浜)

戸口田淳也, 福田 誠, 玉置さくら, 早川和男, 大塚隆信, 岡本 健, 池谷 真, 加藤友久. 肉腫発生機構に関す  
る多能性幹細胞からのアプローチ. 第 72 回日本癌学会総会(2013.10.5. 横浜)

Fukuta, M, Hayakawa K, Tanaki S, Kato T Jr, Ikeya M, Okamoto T, Otuska T, Woltjen K, Toguchida J. Application  
of iPS cell for sarcoma research: investigation for the cell-of-origin of synovial sarcoma. 第 8 回 Combined  
Meeting of Orthopaedic Research Societies(2013.10.14. Venice)

Matsumoto Y, Ikeya M, Hsiao E, Asaka I, Otsuka T, Toguchida J. Application of iPS cells for rare and intractable  
diseases involving mesenchymal tissues. 第 8 回 Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies  
(2013.10.14. Venice)

福田 誠, 早川和男, 玉置さくら, 佐藤信吾, 池谷 真, 大塚隆信, Knut Woltjen, 戸口田淳也. iPS 細胞技術を

用いた滑膜肉腫起源の同定への試み. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会(2013.10.17. 千葉)

小林恭介, 加藤友久, 玉置さくら, 高原直子, 戸口田淳也. 内軟骨性骨化における Ikk $\beta$  の機能解明. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会(2013.10.17. 千葉)

横山宏司, 池谷 真, 那須 輝, 田中孝之, 齋藤 潤, 梅田雄嗣, 西小森隆太, 中畑龍俊, 平家俊男, 戸口田淳也. 罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の解明. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会(2013.10.17. 千葉)

松本佳久, 池谷 真, Edward Hsaio, 横山宏司, 那須 輝, 浅香 勲, 大塚隆信, 戸口田淳也. 人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)を用いた希少難治性骨疾患への取り組み. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会(2013.10.18. 千葉)

Tamaki S, Fukuta M, Hayakawa K, Kato T, Toguchida J. SS18-SSX is a cell-context-dependent epigenetic regulator: implication for cell-of-origin of synovial sarcomas. 第18回 CTOS(2013.10.31. New York)

Fukuta M, Hayakawa K, Tamaki S, Kato T, Ikeya M, Toguchida J. Establishment and differentiation of pluripotent stem cells containing drug-inducible SS18-SSX gene. 第18回 CTOS(2013.11.1. New York)

## 2) 講演・シンポジウム

戸口田淳也. 間葉系幹細胞の至適な培養環境を目指して. 第16回超音波骨折治療研究会(2013.1.19. 東京)

戸口田淳也. 幹細胞研究の骨軟骨疾患への応用. 第4回大分県整形外科・臨床整形外科医会(2013.1.26. 大分)

戸口田淳也. 再生医療の現状と今後. 第20回安寧の都市ユニット公開セミナー(2013.4.13. 京都)

戸口田淳也. iPS 細胞医療応用による人類社会の今後. 第41回技術・経営シンポジウム(2013.4.19. 東京)

戸口田淳也. iPS 細胞時代の再生医療. 第4回京和会(2013.4.26. 京都)

戸口田淳也. 骨・軟部腫瘍遺伝子診断の変遷. 第86回日本整形外科学会学術総会(2013.5.24. 広島)

戸口田淳也. iPS 細胞研究の現状と展望. 第27回北区・上京区有志勉強会(2013.6.8. 京都)

戸口田淳也. 幹細胞研究の肉腫への応用. 第46回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2013.7.12. 東京)

戸口田淳也. iPS 細胞時代の整形外科. 第26回日本臨床整形外科学会学術集会(2013.7.14. 静岡)

戸口田淳也. iPS 細胞技術のがん研究への応用: 肉腫に起源細胞探索. 第4回つくばがん研究会(2013.7.25. つくば)

戸口田淳也. iPS 細胞技術の整形外科領域への応用. 京都整形外科医会(2013.7.27. 京都)

戸口田淳也. iPS 細胞研究の医療応用への展望. 第7回島津イブニングフォーラム(2013.9.5. 幕張)

戸口田淳也. iPS 細胞研究の筋骨格系病態への応用. 第14回 KMU 研究推進セミナー(2013.9.30. 金沢)

戸口田淳也. 整形外科領域への iPS 細胞研究の応用. 第3回東京23区運動器疼痛研究会(2013.10.3. 東京)

戸口田淳也. 幹細胞研究の医学・医療への応用. 第45回藤田学園医学会(2013.10.4. 豊明)

Junya Toguchida. Application of iPS cell technology for musculoskeletal diseases. 第8回 Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies(2013.10.14. Venice)

戸口田淳也. iPS 細胞研究の整形外科領域への応用. 第9回岡山運動器疾患研究会(2013.10.9. 岡山)

戸口田淳也. iPS 細胞が開いた新しい生命科学. 第回平成25年度鳥取県立米子東高等学校「科学を創造する人財育成事業」(2013.10.26. 米子)

戸口田淳也. 再生医療の現状と展望. 第35回近畿地方理学療法学術大会(2013.11.3. 京都)

戸口田淳也. iPS 細胞の整形外科領域への応用. 第40回三河整形医会(2013.11.12. 四日市)

戸口田淳也. iPS 細胞研究の医療への展開. サイエンスエキスポ 2013(2013.11.14. 大阪)

戸口田淳也, 妻木範行, 池谷真. 疾患特異的 iPS 細胞を活用した難治性骨軟骨疾患研究. 第 58 回人類遺伝学会 (2013.11.23. 仙台)

戸口田淳也. iPS 細胞研究の医療への展開. 鳥取県経済同友会西部地区オープン例会 (2013.11.30. 米子)

戸口田淳也. iPS 細胞を用いた in vitro 病態再現の現状と展望. 第 26 回日本動物実験代替法学会 (2013.12.21. 京都)

## 器官形成応用分野 Department of Organ Reconstruction

准教授 角 昭一郎

Assoc. Prof. Shoichiro Sumi

### 【研究概要】

本分野では、糖尿病の再生医療を中心的な研究テーマとしており、全世界で増加している糖尿病に対して、希望すればいつでも受けられる安全で根治的な治療法の開発を目指して研究を行っている。具体的な研究内容としては、長年研究を続けているバイオ人工膵島の実用化に向けた研究、各種の幹細胞等を用いた新しい糖尿病治療用細胞資源の探索、および、これらの作成に不可欠な周辺技術の研究開発である。

重症の糖尿病で、インスリン補充療法による血糖コントロールが困難な場合、膵臓や膵島の移植が適応となる。しかし、ドナー不足と永続的な免疫抑制という移植医療に共通の問題は避けられず、いつでも受けられる安全な治療法という理想からは大きな隔たりがある。また、低侵襲の移植医療として大きな期待を担ってきた膵島移植は、免疫抑制法の改良などにより長期成績の改善傾向があるものの、ドナー不足や免疫抑制の副作用の問題は避けがたい。このような状況の中、糖尿病の再生医療には大きな期待が寄せられている。

膵島再生医療を実現する道筋としては、最も直接的に自己の膵島再生を促進する方法、自己または他者に由来する組織幹細胞あるいはES(胚性幹)細胞やiPS(人工多能性幹)細胞から膵島様細胞を分化誘導する方法、さらに、ヒト以外の異種動物の膵島を分離して利用する方法などが研究されている。しかし、自己由来の細胞ではなく、他者や異種の細胞を移植する場合には拒絶反応の対象となり、また、治療対象となる重症糖尿病の多くが自己免疫の関与する1型糖尿病であることを考慮すると、膵島や膵島様細胞を患者の免疫機構から保護する対策が必要である。本分野では、免疫隔離能を有する各種の半透膜やゲルで膵島や膵島様細胞を包んで拒絶反応を抑制することで、免疫抑制を行うことなく膵島移植と同等の治療効果が期待されるバイオ人工膵の研究を行っている。実際に、国外ではマイクロカプセル化ブタ膵島の腹腔内移植による糖尿病治療の臨床研究がすでに行われており、一定の成果をあげている。しかし、マイクロカプセル化膵島は一度移植すると完全に除去することが困難であり、この点で安全性に限界がある。

本分野では、ラットやブタの膵島分離法を確立し、これらを用いてマイクロカプセル化膵島の研究を行って来た。マイクロカプセル化膵島は、前述のマイクロカプセル化膵島とは対照的に、回収や交換が可能であり、臨床応用にはより有利と考えられる。過去には、メッシュ補強ポリビニルアルコール(PVA)バッグやポリスチレンスルホン酸混合アガロースゲルによるカプセル化など、各種のマクロデバイスの研究開発を行うとともに、あらかじめ血管誘導処置を施した皮下組織にこのようなデバイスを移植することで異種膵島による長期の血糖正常化が達成されることをマウス糖尿病モデルの治療実験で明らかにしてきた。近年では、イヌなど大型動物や最終的な目標であるヒトに応用可能な大型のバイオ人工膵を作製することをめざした新しい独自のバイオ人工膵作成技術として、膵島の凍結保存法と凍結によるPVAのゲル化を組み合わせた作製法を開発して、その有用性をマウスおよびラットの糖尿病モデルへの移植実験で確認している。即ち、膵島凍結保存液にPVAを溶解した粘性の高い溶液に膵島を浮遊させ、この液体をメッシュで補強してシート状に成形した後、凍結・溶解してゲル状のバイオ人工膵シートを作成する。この方法によれば、デバイスの面積や厚さを自由にコントロールすることが可能で、将来の大型化に大きく道を拓

くものと考えている。また、PVA マクロカプセル化膵島は凍結保存が可能で、この点では、輸送・蓄積・品質管理などに対応できるという臨床応用に適した大きな利点を有している。

糖尿病治療用細胞資源探索の分野では、本年は、国立がん研究センターの大木理恵子研究員らとの共同研究で、膵内分泌腫瘍等で高頻度に機能低下が見られる新規がん抑制遺伝子 X の機能抑制による膵島細胞の脆弱性改善・移植効果増強の研究を開始し、当該遺伝子の knock-down や knock-out マウスの分離膵島などを用いて有望な結果を得つつある。また、マウス ES 細胞から  $\beta$  細胞を効率的に分化誘導する研究では、分化初期の definitive endoderm 誘導における activin の役割を研究し、成果の一部を学会発表した。一方、我々はすでに、マウス  $\beta$  細胞株である MIN6 細胞で、細胞塊を形成させることにより膵島特異的な遺伝子発現が増強し、より生理的なブドウ糖－インスリン分泌反応曲線およびインスリン分泌反応の迅速化が実現することを示しているが、本年は、この機能向上が移植効果の向上に繋がるか否かを検討する実験を行う基礎的技術として、細胞塊作成用新規培養面の開発研究に新たに着手し、一定の成果を挙げつつある。また、我々は、脆弱で増殖能が乏しい膵島細胞と高い増殖能を有する間葉系幹細胞とを細胞融合させることで、より糖尿病治療に適した細胞を作製する研究に取り組んできたが、融合細胞が *in vitro* で長期にインスリン分泌能を維持するとともに移植効果も良好であるとの結果を得て発表した。今後はこのような細胞を用いた細胞塊形成による機能向上と PVA マクロカプセル化による免疫隔離などを組み合わせて、新しい糖尿病治療法の実現を目指して研究を展開する予定である。

Our final goal is to establish regenerative medicine for diabetes mellitus, which should be a safe and effective therapy available whenever and wherever required for a growing number of diabetes patients world-wide. Major fields of our research are studies on bioartificial pancreas toward clinical application, search for novel cell sources applicable to diabetes therapy utilizing wide range of cells including various stem cells, and developmental research upon technologies to accomplish these studies.

In severely diabetic patients, pancreas or islet transplantation is indicated, if good control of blood glucose levels is not available. However, donor shortage and complications due to immunosuppressive therapy are inevitable problems of allo-transplantation. In addition, although the long-term outcome of islet transplantation is becoming better due to improved immunosuppression, donor shortage and adverse effects of immunosuppression remain major problems. Therefore, current transplantation therapies are still far from our dream. In such circumstances, much expectations are placed on regenerative medicine for diabetes mellitus.

In order to develop regenerative medicine for diabetes mellitus, there are several different approaches such as enhancement of patient's own islet regeneration, auto- or allo-geneic islet-like cells differentiated from somatic, embryonic or induced pluripotent stem cells *in vitro* and xeno-geneic islets isolated from the pancreas of animals e.g. pigs. However, as long as non-self cells are used and even autologous cells are used to type-1 diabetes that has autoimmune background, efficient immunosuppression should be required. In order to avoid it, we are diligently studying bio-artificial pancreas, in which islet cells are encapsulated by several kinds of semi-permeable membrane or hydrogel and thereby protected from host immune responses. In fact, clinical trial of micro-encapsulated porcine islets are ongoing in a few foreign countries, showing certain beneficial effects. However, micro-encapsulated islets do not allow complete retrieval, which may lower the safety level.

We have established isolation method of porcine pancreatic endocrine cells as well as rat islets. Using these islets, we have successfully shown the efficacy of several macro-devices of bio-artificial pancreas. In contrast to micro



-encapsulation, macro-devices are retrievable and exchangeable, which is important advantage toward clinical application. In our past studies, mesh-reinforced polyvinyl alcohol (PVA) tube and bag, rod-shaped device of agarose containing polystyrene sulfonate, anti-complement substance, and so on were investigated in allo- and xeno-geneic situations. We have also shown that the subcutaneous site pretreated for angiogenesis can be successfully used for transplantation site of these devices, leading to long-term normalization of blood glucose levels in diabetic mice. Recently we developed a novel method to make a sheet-shaped PVA-macroencapsulated islets by a combination of the freezing technique of islets and the phenomenon that PVA solution becomes gel by freezing and thawing. Briefly, islets are suspended in islet freezing solution containing PVA and this viscous solution is molded into a mesh-reinforced sheet and then frozen. This method enables us to make a device of any size with any shape that may be applicable to bigger animals and humans. PVA-macroencapsulated islets are unique cryo-preservable bio-artificial pancreas that allows easy shipping, accumulation and quality-control of the device, which is suitable for clinical usage.

In the year 2012, we started a collaborative study with Dr. Rieko Ohki (National Cancer Center Research Institute) on the effect of knock-down of X, a novel tumor-suppressor gene found in endocrine tumors of the pancreas and lung, on fragility and transplantation efficacy of islets. We also performed in vitro experiment in mouse ES cells and studied the roles of activin in early differentiation toward definitive endoderm and a part of this study was presented in an academic meeting. We have already found that formation of cell cluster of MIN6 cells enhances islet specific gene expression, more physiological glucose-insulin response curve and more rapid insulin release in response to glucose stimulation. In order to investigate the effects of cluster formation in transplantation, we started another study on the novel culture surface to develop high-throughput methods of cell cluster formation and are making good results. We have established a method of cell fusion between islet cells and mesenchymal stem cells and obtained results suggesting that such cells show persistent insulin-release *in vitro* and more efficient after transplantation. This study was published in 2013. We are attempting functional improvement by cell cluster formation of these in vitro processed cells toward realization of new diabetes therapy in combination with PVA-macro encapsulation technique.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Yanai G, Hayashi T, Zhi Q, Yang KC, Shirouzu Y, Shimabukuro T, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Electrofusion of mesenchymal stem cells and islet cells for diabetes therapy : a rat model. PLoS One. 8 : e64499. doi : 10.1371, 2013.

Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Ishida M, Motoi F, Egawa S, Sumi S, Goto M, Unno M. Development of Polyvinyl Alcohol Bioartificial Pancreas with Rat Islets and Mesenchymal Stem Cells. Transplantation Proceedings, 45 : 1875-1880, 2013.

Yang KC, Wu CC, Yang SH, Chiu CC, Sumi S, Lee HS. Investigating the suspension culture on aggregation and function of mouse pancreatic  $\beta$ -cells. J Biomed Mater Res A. 101 : 2273-82, 2013.

Chen PY, Wu CC, Lu DH, Sumi S, Lin FH, Yang KC. Microenvironment-regulated gene expression, morphology,

and in vivo performance of mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Process Biochemistry* 48 : 58-67, 2013.

## 2) 著書・総説等

- Sumi S, Yanai G, Qi M, Sakata N, Qi Z, Yang KC, Shirouzu Y, Hiura A, Gu YJ, Inoue K. Macro-encapsulation of islets in polyvinyl alcohol hydrogel: our experiments. *Journal of Medical and Biological Engineering* (in press)
- 角 昭一郎. 細胞移植(膵島など). 田畑泰彦編集 遺伝子 MOOK 別冊 ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 古くて新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)第2章徐放技術の医療応用 3. 再生治療 p187-p191 (株)メディカルドゥ 大阪 2013.

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- 大田明生, 松村和明, 角 昭一郎, 玄 丞休. ヒト iPS 細胞の緩慢凍結法のためのポリ-L-リジン誘導体凍結保存剤の開発. 第12回日本再生医療学会総会. 横浜市. 2013年3月21-23日.
- Ota A, Matsumura K, Suemori H, Sumi S, Hyon SH. An effective verification of antifreeze polyamino-acid for a slow cryopreservation of human iPS cell and ES cell. *International Society for Stem Cell Research, 11th Annual Meeting*. Boston, USA, June 12-15, 2013.
- Sumi S, Qi Z, Yang KC, Sakata N, Qi M, Shirouzu Y, Yanai G. Macro-encapsulated Islets in Polyvinyl Alcohol Hydrogel. *TERMIS-AP 2013 Annual Conference*. Shanghai & Wuzhen, China, October 23-26, 2013.

### 2) 講演・シンポジウム

- 角 昭一郎. 糖尿病の再生医療に向けた我々の取り組み. 医工学フォーラム 2012. 京都市. 2013年2月27日.
- Sumi S, Iwata H. Introduction of Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University. *Joint Conference of The Research Center for Biomedical Devices and Prototyping Production, Taipei Medical University, The College of Oral Medicine, Taipei Medical University, College of Medicine, Taipei Medical University and The Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University*. Kyoto, Japan, May 13, 2013.
- Sumi S. Creation of pancreatic islets and Bio-Artificial Pancreas. *Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Korean Pancreatobiliary Association 2013. Symposium V Peri-operative Care and Pancreatic Insufficiency*. Seoul, Korea, September 6, 2013.
- 角 昭一郎. 再生医療と糖尿病治療－その将来展望－. 第26回NPO法人再生医療推進センター講演会. 京都市. 2013年9月14日.
- 角 昭一郎. 重症糖尿病に対する新規治療法の研究. 第29回日本糖尿病・妊娠学会年次学術集会イブニングセミナー. 岐阜市. 2013年11月1日.
- Sumi S. Institute for Frontier Medical Sciences Kyoto University, Japan. *JXA Joint Meeting: 16th Japan Xenotransplantation Meeting and the 2nd East Asia Xenotransplantation Symposium*. Introduction of Research Laboratories by Principal Investigators from China, Korea and Japan. Osaka, November 10, 2013.
- 角 昭一郎. 糖尿病治療のための再生医療. 生体医療材料研究センターシンポジウム. 京田辺市. 2013年11月30日.
- 角 昭一郎. 膵疾患と糖尿病の再生医療. 神戸薬科大学大阪同窓会生涯研修. 大阪市. 2013年12月1日.

## 臓器再建応用分野 Department of Bioartificial Organs

准教授 中村 達雄

Assoc. Prof. Tatsuo Nakamura

### 【研究概要】

臓器再建応用分野では、生体内再生“*in situ* Tissue Engineering”の概念に基づいて再生医学を推進し、人類の幸福に貢献することを研究の第一目標にしています。これによって、未だ治療法がない症例や、或いは移植ドナー不足のため治療が受けられない患者さんが救われることを目指しています。さらに、再生医療が普及すると高騰が続いている医療費が抑制されることが期待されると考えています。

人間の体には、本来、再生能が備わっており、我々はそれらを引き出す新しい手法を開発しています。それが生体内再生 *in situ* Tissue Engineering です。すなわち、自己の細胞が増殖、分化できる適切な足場を体内に与えることによって、損傷を受けた自己の臓器が本来の構造と機能を再生出来るようにしています。研究の方法としては、再生医学の3つの柱である(1)足場、(2)細胞、(3)増殖・成長因子を生体内で働かせる生体内再生“*in situ* Tissue Engineering”という手法を独自に開発し、それを進めています。具体的には、同種・異種の臓器や組織から酵素処理で免疫原性を完全になくしたコラーゲンを抽出し、それを用いて作製した細胞外マトリックスや、或いは組織から細胞を完全に除去することにより作製した細胞外基質、さらには生体内で分解吸収される合成高分子を用い、それらに増殖因子などを除放させる DDS(薬物送達システム)を組み合わせることによって、欠落した組織や臓器が再生する枠組みを生体内に作ります。この枠組みを『足場』とし、生体内の幹細胞が増殖、分化することにより、自己の組織や臓器が再生復元されます。また、これらと平行して、iPS細胞や脂肪由来幹細胞を樹立・増殖させて組織再生に用いる研究や、瘢痕状になった細胞外マトリックスを融かして再び本来の性状に戻す研究も進めています。

現在行っている研究対象は下記のように分類されます。

- ①角膜、心膜、胸膜、腹膜、脳硬膜などの膜系
- ②血管、気管、喉頭、消化管などの管状臓器
- ③外力の加わる組織(骨、永久歯、歯根膜)
- ④末梢神経
- ⑤脊髄・脳などの中枢神経系
- ⑥泌尿器系組織
- ⑦肺、腎臓、肝臓、甲状腺、上皮小体、脾臓などの実質性代謝臓器
- ⑧脂肪組織や筋肉組織、皮膚、その他軟組織
- ⑨人工臓器の開発や造影剤の研究
- ⑩手術器具・手術術式の研究
- ⑪バイオマテリアルの研究
- ⑫ロボット手術の研究

当分野の研究の根幹概念は、細胞が増殖、再分化して、元の臓器を復元させうる“場”(環境)を人工的に体の中

に作れば、哺乳動物の臓器や組織も両生類のイモリのように再生復元させることが出来るというメカニズムを医学に応用するものです。このような生体内再生“in situ Tissue Engineering”は世界に先駆けて我々が提唱してきた方法であり、人工気管や人工神経などはすでに臨床応用され、これによって救われる患者さんの数も着々と増えてきています。この新しい技術は21世紀の医療の中心的柱になるものと考えています。

*In situ Tissue Engineering*: We have devised a completely new approach to the development of artificial organs. The main procedure using tissue engineering for tissues and internal organs involves the removal of the cell component from auto- or allo-organs to obtain only the extracellular matrix, so-called refined extracellular matrix (ECM) and reconstitutes the solid structure from the extracted collagen. This ECM or reconstituted structure is then employed as scaffolding, which after implantation into the patients is used for the regeneration or re-differentiation of tissue. Organs made of self-cells thus regenerate. Organs that regenerate in this manner not only possess highly differentiated tissue structures, but also show functional recovery, because all the cells are derived from the patients themselves. Whether or not our new method is practicable will depend mainly on the intrinsic regeneration capacity of each tissue. Up to now, in higher mammals including man, it has been believed that highly differentiated organs lose their ability to regenerate. We consider that mammals do not, in fact, lose this potential, and that the potential is hidden by excessively rapid wound healing around the failing tissues. In this sense, if we can provide good conditions using refined ECM, we can induce this hidden potential even in higher mammals. We have already carried out successful trials at regenerating peripheral nerves, the esophagus, the trachea, and blood vessels with this method. A similar method is also applicable to other soft tissue organs such as the liver, heart, and lung, as well as the spinal cord. These results will be welcomed by patients who are dependent on palliative life-support systems, or transplantation candidates who are waiting for suitable donors. An additional benefit is that patients will be freed from the side effects of immunosuppressive drugs. The judgment of the brain death can then be discussed separately from the issue of transplantation, and will become a personal problem. Further more, this new approach help to reduce ever-expanding medical costs, which are in danger of destroying our health insurance system in the near future.

No study based on these concepts has ever been done either in Japan or abroad. In this sense, our pioneering work is expected to be a major area of medical science for the coming generation.

### **Strategy and targets of our study**

The target organs currently being considered for this development project are the heart, heart valves, esophagus, stomach, intestine, gallbladder, trachea, lung, liver, kidney, peripheral nerves, spinal cord, cornea, tendons, ligaments, cartilage, bone, fatty tissue, periodontal tissue, and permanent teeth. We plan to employ the two major methods as described below.

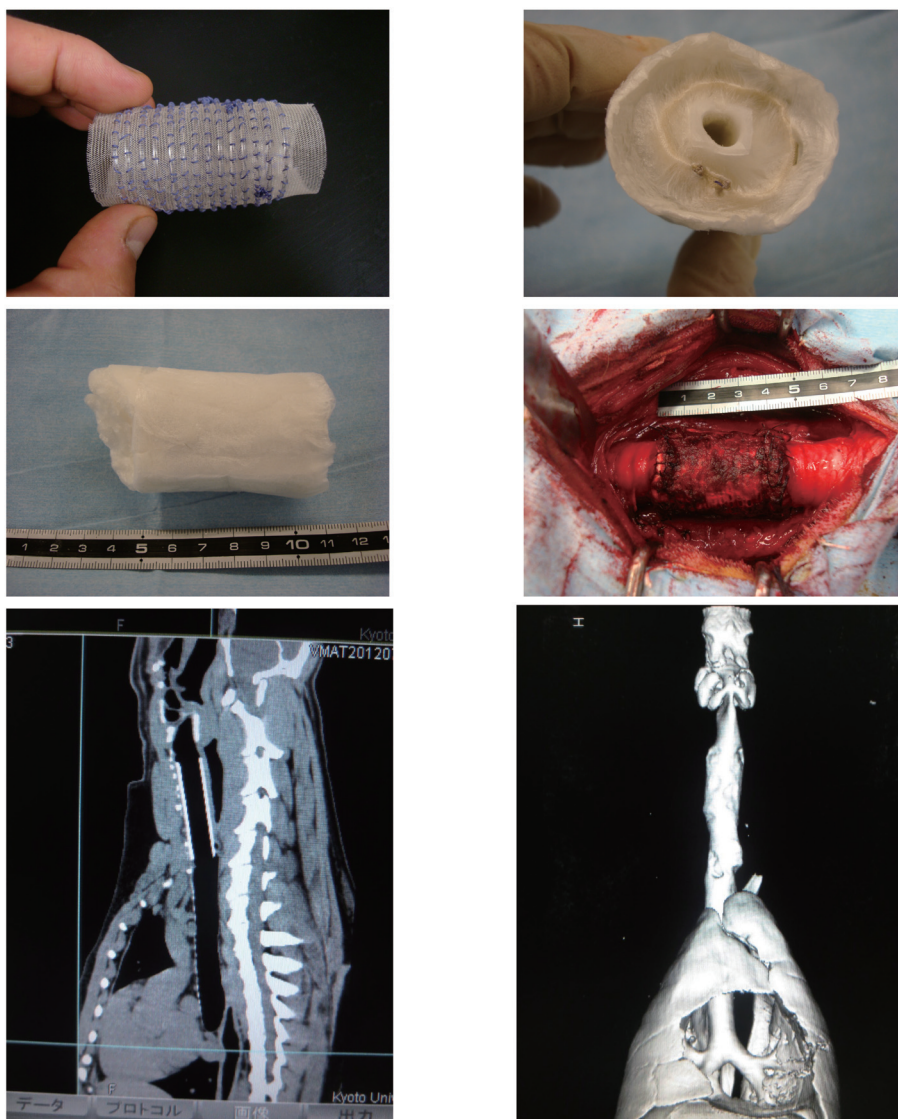
### **ECM Method**

To obtain the purified extracellular matrix, cell components are completely removed from homo or allo-organs. The solid structure is reconstituted from the ECM and extracted collagen. Growth factors are then applied to facilitate cell proliferation. Then this ECM-collagen-growth factor composite is implanted into the living body as a tem-

porary scaffolding for new organ regeneration. Besides this, bioabsorbable materials will also be applied instead of purified ECM as a bulk structure for organ regeneration. Both extracted collagen and growth factors are should facilitate cell proliferation and cell redifferentiation, leading to regeneration of organs completely composed of cells derived from patients.

### ***In situ* Tissue Engineering and Field theory**

Cells (or living tissues) of patients are complexed(mixed)with purified ECM or bioabsorbable material. Using this complex, reconstruction of the failing tissues or organs will be attempted. Mesenchymal stem cell(MSC)obtained from the bone marrow is now applied to this method.



人工気管の開発：世界初の自己組織再生型的人工気管を開発し 2002 年より臨床で使っています。これは気管壁が完全に生体組織に置き換わる、さらに新しいタイプ的人工気管で、動物実験を行いその有効性と長期安全性を評価しています。下段の CT は埋入 13 ヶ月目の CT 所見。再生した気管が気道を形成しているのが見られる。

Artificial Trachea has been developed in our group more than 30 years. Since 2002 it was clinically applied to the patients. These figures are new type of our artificial trachea composed of bio-absorbable material and collage. The tracheal wall is designed to be replaced with host tissue.



## 【業績目録】

## ◆ 誌上発表 ◆

- 中村達雄：人工神経管(PGA-C tube)による末梢神経再生と *in situ* Tissue Engineering(生体内再生)－慢性神経因性疼痛は脳の錯覚か？－. 日本臨床麻酔学会誌. **33**: 507-512(2013)
- 中村達雄, 稲田有史, 萩原明於, 金丸眞一, 瀬尾憲司：人工神経 PGA-C Tube と *in situ* Tissue Engineering. 再生医療. **12**: 43-47(2013)
- Nakamura, T., Kojima, F., Sato, T., Hamaji, M., Kaneko, M., Kanemaru, S., Nakada, A., Omori, K., Shigeno, K., Wakatsuki, M., Endo, K.: Novel tracheal prosthesis using *in situ* Tissue Engineering. *Int J Artif Organs* **36**:585 (2013)
- Shigeno, K., Kaneko, M., Wakatsuki, M., Nakada, A., Hashimoto, Y., Honda, M., Inada, Y., Nakamura, T.: Regeneration of Canine Inferior Alveolar Nerve by Polyglycolic Acid-Collagen Tube with Platelet Rich Plasma. *Int J Artif Organs*. **36**:571(2013)
- Kaneko, M., Wakatsuki, M., Shigeno, K., Nakada, A., Nakamura, T.: Sequential Changes of Bone Repairing in Rabbit Skull Defect Implanted Octacalcium Phosphate and Collagen Composite. *Int J Artif Organs*. **36**:572 (2013)
- 金子真弓：次世代の歯科医院経営－人口減少時代は、患者育成が鍵になる－. 歯界展望. **121**: 920 -926(2013)
- Wakatsuki, M., Kaneko, M., Nakada, A., Shigeno, K., Nakamura, T.: Promotion of Bone Repairing by Use of Collagen Scaffold Incorporating Recombinant Human FGF-2 in Rabbit Skull Defect Model. *Int J Artif Organs*. **36**:551 (2013)
- Nakada, A., Shigeno, K., Sato, T., Kobayashi, T., Wakatsuki, M., Uji, M., Nakamura, T.: Manufacture of a weakly denatured collagen fiber scaffold with excellent biocompatibility and space maintenance ability. *Biomed Mater*. **8**: 45010-45019(2013)
- Machiguchi, T., Nakamura, T.: Cellular interactions via conditioned media induce *in vivo* nephron generation from tubular epithelial cells or mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **435**: 327-333(2013)
- 大森孝一, 多田靖宏, 野本幸男, 谷垂希子, 金丸眞一, 中村達雄：生体内組織再生誘導型の人工気管を用いた気道再建. 再生医療. **12**: 57-63(2013)
- Imaizumi, M., Nomoto, Y., Sato, Y., Sugino, T., Miyake, M., Wada, I., Nakamura, T., Omori, K.: Evaluation of the use of induced pluripotent stem cells(iPSCs) for the regeneration of tracheal cartilage. *Cell Transplantation*. **22**: 341-353(2013)
- Nomoto, M., Nomoto, Y., Tada, Y., Tani, A., Otsuki, K., Suzuki, R., Nakamura, T., Omori, K.: Bioengineered trachea using autologous chondrocytes for regeneration of tracheal cartilage in a rabbit model. *Laryngoscope*. **123**: 2195-2201(2013)
- Kanemaru, S., Umeda, H., Yamashita, M., Hiraumi, H., Hirano, S., Nakamura, T., Ito, J.: Improvement of eustachian tube function by Tissue-Engineered regeneration of mastoid air cells. *Laryngoscope*. **123**: 472-476(2013)
- Kanemaru, S., Kitani, Y., Ohno, S., Shigemoto, T., Kojima, T., Ishikawa, S., Mizuta, M., Hirano, S., Nakamura, T., Dezawa, M.: Functional regeneration of laryngeal muscle using bone marrow-derived stromal cells. *Laryn-*

- goscope. **123** : 2728-34(2013)
- Seo, K., Inada, Y., Terumitsu, M., Nakamura, T., Shigeno, K., Tanaka, Y., Tsurumaki, T., Kurata, S., Matsuzawa, H. :  
Protracted delay in taste sensation recovery after surgical lingual nerve repair : a case report. *Journal of Medical Case Reports*. **7** : 77-81 (2013)
- Uji, M., Nakada, A., Nakamura, T. : Intravenous administration of adipose-derived stromal cells does not ameliorate bleomycin-induced lung injury in rats. *Open J Regen Med*. **2** : 39-45(2013)
- Tatekawa, Y., Nakada, A., Nakamura, T. : Intrahepatic biliary ablation with pure ethanol : an experimental model of biliary atresia. *Surg Today*. **46** : 661-669(2013)
- Kojima, F., Sato, T., Takahata, H., Okada, M., Sugiura, T., Oshiro, O., Date, H., Nakamura, T. : A novel surgical marking system for small peripheral lung nodules based on radio frequency identification technology : Feasibility study in a canine model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013 Jul 13. doi : 10.1016/j.jtcvs.2013.05.048. [Epub ahead of print]
- 高畑裕美, 小島史嗣, 杉浦忠男, 岡田 実, 佐藤寿彦, 角田 茂, 中村達雄, 伊達洋至, 大城 理. RFIDを用いた消化管用クリップの位置特定～イヌ食道における検討～. *日本コンピュータ外科学会誌* (in press)
- Hirano S, Mizuta M, Kaneko M, Tateya I, Kanemaru SI, Ito J. Regenerative phonosurgical treatments for vocal fold scar and sulcus with basic fibroblast growth factor. *Laryngoscope*. **123** : 2749-55(2013)
- Mizuta M, Hirano S, Ohno S, Hiwatashi N, Tateya I, Kanemaru S, Nakamura T, Ito J. Effect of astaxanthin on vocal fold wound healing. *Laryngoscope*. (in press)
- Mizuta M, Hirano S, Ohno S, Kanemaru SI, Nakamura T, Ito J. Restoration of scarred vocal folds using 5 amino acid-deleted type hepatocyte growth factor. *Laryngoscope*. (in press)
- Hamaji, M., Omasa, M., Chen, F., Yamada, T., Sato, M., Menju, T., Sato, T., Aoyama, A., Sonobe, M., Bando, T., Date, H. : Survival and treatments in patients with incompletely resected thymoma. *Asian Thoracic and Cardiovascular Annals*. (in press)
- Hamaji, M., Cassivi, SD., Shen, KR., Allen, MS., Nichols, FC., Deschamps, C., Wagle, DA. : Prior thoracoscopic surgery may improve reoperative pulmonary resection. *Asian Thoracic and Cardiovascular Annals*. (in press)
- Hamaji, M., Cassivi, SD., Shen, KR., Wagle, DA., Allen, MS., Nichols, FC., Deschamps, C. : The outcome of pulmonary resection for invasive fungal infection complicating haematological malignancy. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013 Nov 15. [Epub ahead of print]
- Hamaji, M., Burt, BM., Ali, SO., Mirkovic, J. : An incidental and uncommon pulmonary sequestration with an uncommon feeding artery. *Int J Surg Case Rep*. **4** : 861-2(2013)
- Hamaji, M., Tanaka, T., Tachi, H., Ohsumi, A. : Thoracoscopic 360 degree apical pleurodesis with turned-over parietal pleura. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013 Aug 4. [Epub ahead of print]
- Hamaji, M., Vanderlaan, PA., Sugarbaker, DJ., McNamee, CJ. : A microthymoma and no germinal centre in myasthenia gravis. *Eur J Cardiothorac Surg*. **44** : 1146-7(2013)
- Hamaji, M., Allen, MS., Cassivi, SD., Deschamps, C., Nichols, FC., Wagle, DA., Shen, KR. : Surgical treatment of metachronous second primary lung cancer after complete resection of non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **145** : 683-90 ; discussion 690-1 (2013)
- Hamaji, M., Tanaka, T. : A personal experience of 2-year general thoracic surgery training programs in Japan and

- the United States. Gen Thorac Cardiovasc Surg. **61** : 139-42 (2013)
- Hamaji, M., Burt, BM., Ali, SO., Cohen, DM. : Spontaneous diaphragm rupture associated with vaginal delivery. Gen Thorac Cardiovasc Surg. **61** : 473-5 (2013)
- Tamura, K., Harada, Y., Kunimi, M., Takemitsu, H., Hara, Y., Nakamura, T., Tagawa, M. : Long-term follow-up of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation following surgical decompression in a dog with chronic spinal cord injury. Exp Clin Transplant. (in press)
- 早川克己 : 特集 乏尿も Cr も怖くない！急性腎障害はこう診る！画像でわかる急性腎障害. これはおさえておきたい！急性腎障害の画像所見レジデントノート. **14** : 3433-3442 (2013)
- 早川克己 : 造影剤に対する Breakthrough reaction 前投薬としてのステロイドの臨床的価値. 臨床画像. **29** : 770-776 (2013)
- 早川克己, 山本栄司, 吉田麻里子, 立元将太 癌の術後画像診断－合併症と局所再発のチェックポイント－第 6 章. 大腸癌画像診断臨時増刊号. **33** : 770-776 (2013)
- Hayakawa, K., Tanikake, M., Yoshida, S., Urata, Y., Yamamoto, E., Morimoto, T. : Radiological diagnosis of large-bowel obstruction : neoplastic etiology. Emerg Radiol. **20** : 69-76 (2013)
- Hayakawa, K., Tanikake, M., Yoshida, S., Yamamoto, A., Yamamoto, E., Morimoto, T. : CT findings of small bowel strangulation : the importance of contrast enhancement. Emerg Radiol. **20** : 3-9 (2013)
- Ogura, A., Hayakawa, K., Maeda, F., Kajihara, M., Takatsu, Y., Mamamura, K. : Characterization of Carotid Artery Plaque Components on Magnetic Resonance Imaging Using Signal Intensity of the Phantom as a Reference. Acad Radiol **20** : 1551-1556 (2013)

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 著 書

- 中村達雄, 萩原明於, 稲田有史, 金丸眞一 : 末梢神経の再生医療. 「神経系」(編集 : 岡野栄之, 出澤真理, 発行 : 株式会社朝倉書店, 全 192 頁) 138-153 (2013)
- 中村達雄, 稲田有史 : PGA-C Tube (人工神経) による末梢神経再生. 「臨床医のための再生整形外科」(編集主幹 : 平澤泰介, 三浪明男, 戸山芳昭, 編集顧問 : 糸満盛憲, 望月一男, 編集委員 : 井樋栄二, 石黒直樹, 久保俊一, 吉川秀樹, 越智光夫, 小宮節郎, 寺田弘司, 発行 : 株式会社寺田国際事務所 / 先端医療技術研究所) 120-123 (2013)

### 2) 学会等の発表

- Nakamura, T., Kojima, F., Sato, T., Hamaji, M., Kaneko, M., Kanemaru, S., Nakada, A., Omori, K., Shigeno, K., Wakatsuki, M., Endo, K. : Novel tracheal prosthesis using *In situ* Tissue Engineering. 40th Annual ESAO Congress (2013.9.11-14. Scotland)
- 稲田有史 : 究極再建のあり方. The first orthoplastic meeting (2013.2.15. 東京)
- 稲田有史, 田中克己, 平瀬雄一, 山野慶樹 : 究極の再建のあり方－実際の症例を提示し, 4 名の講師を中心に討論. The first orthoplastic meeting (2013.2.16. 東京)
- 稲田有史 : CRPS (Complex regional pain syndrome : 複合性局所疼痛症候群) と診断された症例に対する生体内再

- 生治療～病態別治療と300例長期成績からの提言～. 第42回日本慢性疼痛学会(2013.2.23. 東京)
- 稲田有史: 整形外科外来での慢性疼痛管理－原因追及はどこまで可能なのか. 第304回福岡臨床整形外科医会研修会(2013.3.13. 福岡)
- 稲田有史: CRPS など①座長. 第56回日本手外科学会学術集会(2013.4.19. 神戸)
- 稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七郎, 川西弘一, 面川庄平: CRPS と診断された上肢患者に対する生体内再生治療の治療戦略と長期治療結果. 第56回日本手外科学会学術集会(2013.4.19. 神戸)
- 稲田有史: 重傷四肢外傷の救い方. 第5回日本重度四肢外傷セミナー(2013.7.14. 札幌)
- Inada, Y.: Surgical outcome of in-situ tissue engineering with a PGA-C tube for 206 patients diagnosed with CRPS in the upper extremities. The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Musculoskeletal System and Pain(2013.7.26)
- 稲田有史: 重度四肢外傷機能再建. 日本骨折治療学会 第5回アドバンコース研修会(2013.9.15. 東京)
- Shigeno, K., Kaneko, M., Wakatsuki, M., Nakada, A., Hashimoto, Y., Honda, M., Inada, Y., Nakamura, T.: Regeneration of Canine Inferior Alveolar Nerve by Polyglycolic Acid-Collagen Tube with Platelet Rich Plasma. 40th Annual ESAO Congress(2013.9.11-14. Scotland)
- Kaneko, M., Wakatsuki, M., Shigeno, K., Nakada, A., Nakamura, T.: Sequential Changes of Bone Repairing in Rabbit Skull Defect Implanted Octacalcium Phosphate and Collagen Composite. 40th Annual ESAO Congress(2013.9.11-14. Scotland)
- 金子真弓: 歯科医療の新たな価値創造とは. 劇的な変化をチャンスとして捉え, 自ら変化を引き起こす経営戦略～その考え方とノウハウ～(2013.11.17. 東京)
- Wakatsuki, M., Kaneko, M., Nakada, A., Shigeno, K., Nakamura, T.: Promotion of Bone Repairing by Use of Collagen Scaffold Incorporating Recombinant Human FGF-2 in Rabbit Skull Defect Model. 40th Annual ESAO Congress(2013.9.11-14. Scotland)
- Mizuta, M., Hirano, S., Tateya, I., Hiwatashi, N., Kanemaru, S., Ito, J.: The effect of astaxanthin on vocal fold wound healing. The 134th American Laryngological Association(2013.4.10-11. Orlando)
- Kojima, F., Sato, T., Takahata, H., Okada, M., Sugiura, T., Oshiro, O., Date, H., Nakamura, T.: In-Vivo Localization of Micro Radio Frequency Identification Tag: Concept Proof of Novel Surgical Marking System for Small Peripheral Lung Nodule. 第21回アジア胸部心臓血管外科学会(2013.4.6. 神戸)
- 小島史嗣, 佐藤寿彦, 高畑裕美, 杉浦忠男, 岡田実, 大城理, 伊達洋至, 中村達雄: 超小型無線タグを用いた微小病変マーキングシステムの開発～疑似病変切除モデルによる実証～. 第30回日本呼吸器外科学会総会(2013.5.9. 名古屋)
- Takahata, H., Sugiura, T., Kojima, F., Sato, T., Okada, M., Oshiro, O.: Impact of Transmission Power Variation to the Position Estimation Error Performance of RFID-tag Assisted Surgery Support System. International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society(EMBC'2013)(2013.7. Osaka)
- 小島史嗣, 佐藤寿彦, 角田 茂, 伊達洋至, 中村達雄: 近距離無線通信技術を応用した新たな手術用マーキングシステムの開発. 第26回日本内視鏡外科学会総会パネルディスカッション13 先端技術の内視鏡外科への応用(2013.11.29. 福岡)
- 西澤祐吏: 肛門機能の再生・再建を目指した新たな治療コンセプト. 第113回日本外科学会(2013.4.11. 福岡)
- 西澤祐吏, 鈴木康之, 中村達雄, 荒木 淳, 齋藤典男, 伊藤雅昭: 肛門機能の再生・再建を目指した基礎研究の成果. 第67回手術手技研究会(2013.5.17. 札幌)

- 西澤祐吏. 肛門機能の再生・再建を目指した新たな治療コンセプトー括約筋再生・神経機能再生から肛門移植, 術後機能評価までー. 第23回骨盤外科機能温存研究会(2013.6.29. 東京)
- 西澤祐吏, 荒木 淳, 佐藤知行, 内藤宗和, 秋田恵一, 光嶋 勲, 鈴木康之: 肛門機能再建を目的とした肛門移植の可能性. 第68回日本消化器外科学会総会(2013.7.17. 宮崎)
- 西澤祐吏, 河合俊和, 西川 敦, 中村達雄, 鈴木康之: 内視鏡下手術支援ロボット LODEM を用いた Reduced Port Surgery のコンセプト. 単孔式内視鏡手術研究会(2013.8.2. 盛岡)
- 西澤祐吏: 新たな肛門機能の再生・再建コンセプトと神経機能の重要性. 第19回大腸肛門機能障害研究会(2013.9.7. 東京)
- 西澤祐吏: ソロサージェリー・へき地医療のための簡易なモバイル内視鏡手術支援システムの開発. 医工連携推進シンポジウム(2013.10.7. 東京)
- 西澤祐吏, 荒木 淳, 鈴木康之: 肛門機能の再生・再建を目指した基礎研究の成果. 第21回日本消化器関連学会(2013.10.9. 東京)
- 西澤祐吏, 佐藤知行, 伊藤雅昭, 齋藤典男, 鈴木康之: 肛門機能不全に対する新たな治療コンセプトと神経機能の重要性. 第68回日本大腸肛門病学会(2013.11.15. 東京)
- 西澤祐吏. 腹腔鏡下手術におけるソロサージェリーを支援するデバイス開発: 第26回日本内視鏡外科学会(2013.11.28. 福岡)
- 西澤祐吏, 河合俊和, 西川 敦, 中村達雄, 近藤彰宏, 藤原理朗, 鈴木康之: 内視鏡下手術支援ロボット M-LODEM を用いた Solo-Surgery のコンセプト. 第26回日本内視鏡外科学会(2013.11.28. 福岡)
- 西澤祐吏, 和田侑希子, 西浦文平, 藤井喬之, 近藤彰宏, 阪部雅章, 浅野栄介, 西村充孝, 大島 稔, 柏木裕貴, 山本尚樹, 赤本伸太郎, 藤原理朗, 岡野圭一, 臼杵尚志, 鈴木康之: 大腸癌に対する腹腔鏡下单孔式手術の適応・手技・成績. 第25回 香川県外科医会(2013.11.9. 高松)
- 錦織英知, 伊藤雅昭, 塚田祐一郎, 西澤祐吏, 菅野伸洋, 西澤雄介, 小林昭広, 杉藤正典, 齋藤典男: 腹腔鏡下直腸癌手術の定型化への取り組みと治療成績. 第113回日本外科学会(2013.4.11. 福岡)
- Nishizawa, Y., Kawai, T., Nakamura, T., Suzuki, Y.: Local operated detachable endo-effect of manipulator for endoscopic surgery. 2013 Society of American Gastrointestinal and Endoscopic Surgeons(2013.4.17. Baltimore)
- Kawai, T., Nishio, K., Morita, Y., Nishizawa, Y., Nakamura, T.: Sensing Elasticity from the Phase Difference of the Stepper Motor. The 35th Annual International Conference of the Engineering in Medicine and Biology Society(2013.7.3. 大阪)
- Kawai, T., Shin, M., Horise, Y., Nishikawa, A., Nishizawa, Y., Nakamura, T.: Mobile-type Locally Operated Detachable End-effector Manipulator for Laparoscopic Surgery. International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery(2013.6.26. Heidelberg)
- 松本俊宣, 申明奎, 河合俊和, 西川敦, 西澤祐吏, 中村達雄: 内視鏡下手術支援ローカル操作型可搬マニピュレータの評価. 第22回日コンピュータ外科学会(2013.9.14. 東京)
- 福西正啓, 河合俊和, 西川敦, 西澤祐吏, 中村達雄: 足底軌跡と作用力による非装着型操作インタフェースの提案. 第25回ロボティクス・メカトロニクス講演会(2013.5.22. 筑波)
- 松本俊宣, 河合俊和, 西川敦, 西澤祐吏, 中村達雄: 単孔式内視鏡下手術鉗子のボールスクリュウ差動駆動機構. 第25回ロボティクス・メカトロニクス講演会(2013.5.22. つくば)
- Araki, J., Nishizawa, Y., Sato, T., Naito, M., Akita, K., Tashiro, K., Iida, T., Koshima, I.: Experimental study of new



- vascularized composite allotransplantation : Anorectal transplantation with rats, dogs, and human cadavers. 11th Meeting of the International Hand and Composite Tissue Allotransplantation Society (2013.8.29. Wrocław)
- Araki, J., Nishizawa, Y., Sato, T., Naito, M., Akita, K., Tashiro, K., Iida, T., Koshima, I.: Anorectal transplantation research for the stoma patients. 6th European Plastic Surgery Research Council (2013.8.22. Hamburg)
- Araki, J., Nishizawa, Y., Sato, T., Naito, M., Akita, K., Tashiro, K., Iida, T., Koshima, I.: Anorectal transplantation research with rats, dogs, and human cadavers. World Society of Reconstructive Microsurgery 2013 Congress (2013.7.11. Chicago)
- 田村勝利：獣医医療における再生医療～脊髄の再生～. 第9回日本獣医内科学アカデミー. 脊髄の再生. (2013.2.24. 横浜)
- 田村勝利：脊髄損傷の動物に対する再生医療の現状. 第51回日本大学獣医学会. 動物医療における再生医療を考える. (2013.6.30. 藤沢)
- 茂野啓示：ジルコニアとCAD/CAMの今：生体親和性と Esthetic Longevity. 東京医科歯科大学, 卒後教育講演 (2013.2.3)
- 茂野啓示：A novel diagnostic method of the occlusion and function with M.R.I. The American Prosthodontist. (2013.4.20)
- 茂野啓示：A novel diagnostic method of the occlusion and function with M.R.I. Boston University, Post doctoral education program (2013.4.22. Boston)
- 茂野啓示：Raymond L. Kim の臨床を語る. Study club Kumamoto S. J. C. D. (2013.9.1)
- 吉田麻里子, 野橋智美, 佐藤文恵, 里上直衛, 森澤信子, 谷掛雅人, 藤本良太, 早川克己, 多田弘史, 田中千晶：脊柱管内髄膜腫の5例. 第303回日本医学放射線学会関西地方会(第375回レントゲンアーベント) (2013.2.2. 大阪)
- 立元将太, 里上直衛, 野橋智美, 佐藤文恵, 森澤信子, 谷掛雅人, 藤本良太, 早川克己, 瀬戸瑠里子, 宮原 亮, 河野文彦：胸腔鏡下肺生検にて診断された網谷病の1例. 第303回日本医学放射線学会関西地方会(第375回レントゲンアーベント) (2013.2.2. 大阪)
- 立川裕之, 谷掛雅人, 佐藤文恵, 早川克己, 藤本良太, 正木元子, 岡田 隆：IVC filter の migration を来した一例. 日本 INTERVENTIONAL RADIOLOGY 学会第33回関西地方会(第54回関西 INTERVENTIONAL RADIOLOGY 研究会) (2013.2.16. 大阪)
- 谷掛雅人, 立川裕之, 佐藤文恵, 早川克己, 藤本良太：造影剤を使用せずに IVC filter を留置する工夫. 日本 INTERVENTIONAL RADIOLOGY 学会第33回関西地方会(第54回関西 INTERVENTIONAL RADIOLOGY 研究会) (2013.2.16. 大阪)
- 早川克己：生涯教育セミナー 症例から学ぶ/救急疾患の画像診断 婦人科救急疾患の画像診断. 第32回日本画像医学会 (2013.2.22-23. 東京)
- Hayakawa, K., Yoshida, S., Tatekawa, H., Yamori, Y., Kanda, T., Yoshida, N., Hirota, H., Iwami, M., Nakamura, K.: Functional correlation of the spastic hemiplegic patients with MR findings. 25th European Congress of Radiology (ECR 2013) (2013.3.7-11. Vienna)
- 木下香苗, 伊藤禎章, 古川 修, 石原太輔, 鵜飼将平, 中村寿伸, 北田久美子, 早川克己, 亀田佐知代, 上松晃子, 宮本俊朗, 張 孝徳, 寺師卓哉, 大迫 努：当院での呼吸サポートチームの現状と課題. 第10回院内合同

研究発表会(2013.3.23. 京都)

早川克己：特別講演 造影剤の安全性：CT 検査で注意する患者とは？. 第 48 回香川県放射線科医会(2013.3.30. 高松)

早川克己, 谷掛雅人, 佐藤文恵, 里上直衛, 藤本良太, 松尾宏一, 里 輝幸, 山本栄司：非外傷性大腸穿孔の CT 診断の検討. 第 72 回日本医学放射線学会総会(2013.4.11-14. 横浜)

立川裕之, 藤本良太, 早川克己：小児脳 MRI の読み方. 第 72 回日本医学放射線学会総会(2013.4.11-14. 横浜)

吉田麻里子, 立川裕之, 里上直衛, 野橋智美, 佐藤文恵, 森澤信子, 谷掛雅人, 藤本良太, 早川克己, 河野文彦：肉眼病理像から小腸疾患とその画像診断を考える. 第 72 回日本医学放射線学会総会(2013.4.11-14. 横浜)

立元将太, 早川克己, 藤本良太, 谷掛雅人, 森澤信子, 里上直衛, 野橋智美, 佐藤文恵, 立川裕之, 吉田麻里子：硬膜内腫瘍：鑑別診断のポイント. 第 72 回日本医学放射線学会総会(2013.4.11-14. 横浜)

早川克己, 谷掛雅人, 立川裕之, 佐藤文恵, 吉田麻里子, 里上直衛, 藤本良太, 江村正仁, 大迫 努：ワークショップ 出血に対する IVR 略血に対する動脈塞栓術の検討：2000 年以降の成績. 第 42 回日本 IVR 学会総会(2013.5.16-18. 軽井沢)

金井創太郎, 塩見 梢, 松下浩子, 岡野創造, 早川克己, 森本昌史\*：脊髄性筋萎縮症 1 型に水頭症を合併した一例. 第 55 回日本小児神経学会学術集会(2013.5.30-6.1. 大分)

早川克己：まだ, 注腸検査なんかやってるの？. 第 28 回放射線診療安全向上研究会〈IVR と画像診断のヒヤリ・ハット研究会〉(2013.6.7. 京都)

早川克己：放射線科医としての後期研修主要拠点病院放射線科部長からの一言. 第 9 回前期臨床研修医のための画像診断セミナー(2013.6.9. 兵庫)

早川克己, 吉田麻里子, 立元将太, 山内哲司, 森澤信子, 里上直衛, 谷掛雅人, 藤本良太：放射線科後期研修医の 2 年間の CT・MRI の読影件数. 第 304 回公益社団法人日本医学放射線学会関西地方会(第 376 回レントゲンアーベント)(2013.6.15. 大阪)

早川克己：講演 造影剤の安全性：CT 検査で注意する患者とは？. 岩手医科大学平成 25 年度医療安全対策講習会(2013.7.2. 盛岡)

早川克己：ミニレクチャー 造影剤腎症の最近のトピックス. 第 46 回北近畿画像診断 IVR 勉強会(2013.7.6. 福知山)

早川克己：特別講演 略血の IVR. 第 3 回南大阪画像診断 IVR 研究会(2013.7.26. 大阪)

谷掛雅人, 早川克己, 藤本良太：症例検討 胸部心血管周産期心筋症の一例. 第 72 回救急放射線画像研究会(2013.9.13. 大阪)

早川克己：特別講演と症例提示 腹部救急の画像診断. 第 3 回基礎からの画像診断セミナー(2013.9.20. 名古屋)

早川克己, 谷掛雅人, 松尾宏一, 里 輝幸, 山本栄司, 里上直衛, 藤本良太, : 非外傷性大腸穿孔の CT 診断. 第 23 回日本救急放射線研究会(2013.10.14. 名古屋)

川辺民昭, 三宅秀一, 古市佳也, 野田みゆき, 河野文彦, 早川克己：環境測定結果からみたホルマリン作業環境管理の現状と課題. 第 52 回全国自治体病院学会(2013.10.17-18. 京都)

園山和代, 小木信子, 三宅秀一, 森口喜生, 早川克己：乳がん患者会ボランティアへの参加経験. 第 52 回全国自治体病院学会(2013.10.17-18. 京都)

木下香苗, 石原太輔, 古川 修, 伊藤禎章, 鵜飼将平, 中村寿伸, 早川克己：当院の人工呼吸管理における臨床工学技士の役割と展望. 第 52 回全国自治体病院学会(2013.10.17-18. 京都)

- 伊藤禎章, 鷗飼將平, 蒨 幸祐, 木下香苗, 古川 修, 石原太輔, 中村寿伸, 早川克己: より安全で最適な医療を提供する為の臨床工学技士の役割. 第 52 回全国自治体病院学会(2013.10.17-18. 京都)
- 石原太輔, 中村寿伸, 伊藤禎章, 鷗飼將平, 早川克己: 医療ガスアウトレットをシュレッダー方式からピン方式への変更を経験して. 第 52 回全国自治体病院学会(2013.10.17-18. 京都)
- 早川克己: 特別講演 医療被曝防止の知識. 第 215 回与謝医師会学術研修会兼与謝医師会医療安全講演会(2013.10.17. 宮津)
- 早川克己: 肺癌術後の胸部単純写真. 第 200 回関西アンギオ・IVR カンファレンス, 第 29 回放射線診療安全向上研究会〈IVR と画像診断のヒヤリ・ハット研究会〉(2013.10.19. 大阪)
- 立元将太, 早川克己, 藤本良太, 吉田菜穂子, 廣田陽代, 岩見美香, 中村恵子: 拡散テンソル画像を用いた痙直型片麻痺児の健側脳と健常児の脳との比較. 第 8 回小児神経放射線研究会(2013.10.26. 京都)
- 立元将太, 早川克己, 藤本良太, 岡野創造, 松下浩子, 塩見 梢, 黒田啓史: 早期産児における満期産相当時の Diffuse Excessive High Signal Intensity の有無と予後との関係. 第 8 回小児神経放射線研究会(2013.10.26. 京都)
- 早川克己, 立川裕之, 岡野創造, 松下浩子, 塩見 梢, 立元将太, 里上直衛, 谷掛雅人, 藤本良太, 黒田啓史: 早期産児における term 時期の MRI による予後推定の後方視的研究. 第 8 回小児神経放射線研究会(2013.10.26. 京都)
- 谷掛雅人, 山内哲司, 加藤彩子, 里上直衛, 森澤信子, 松村貴代, 藤本良太, 早川克己: 造影 CT 検査における急変の実態とシミュレーショントレーニング. 第 305 回公益社団法人日本医学放射線学会関西地方会(第 377 回レントゲンアーベント)(2013.11.2. 大阪)
- 早川克己, 吉田麻里子, 立元将太, 山内哲司, 大野文美, 加藤彩子, 森澤信子, 里上直衛, 谷掛雅人, 藤本良太: 放射線科後期研修医の 2 年間の US・Angio/IVR・TV 系検査の実施件数. 第 305 回公益社団法人日本医学放射線学会関西地方会(第 377 回レントゲンアーベント)(2013.11.2. 大阪)
- 吉田麻里子, 山内哲司, 里上直衛, 森澤信子, 松村貴代, 谷掛雅人, 藤本良太, 早川克己, 山本栄司, 岡本直樹: 限局性小腸拡張症の一例. 第 305 回公益社団法人日本医学放射線学会関西地方会(第 377 回レントゲンアーベント)(2013.11.2. 大阪)
- 早川克己: 講義 発達と小児神経疾患－原点に立ち返って頭部画像検査(MRI を中心に). 第 43 回小児神経学セミナー(2013.11.2-4. 大阪)
- 早川克己: 特別講演 造影剤の副作用のリスクマネージメント. 第 76 回撮影技術セミナー(2013.11.14. 京都)
- Hayakawa, K., Tatekawa, H., Okano, S., Matsushita, H., Shiomi, K., Satogami, N., Tanikake, M., Fujimoto, R., Kuroda, H.: Quantitative Ventriculometry for Children Using MRI. Radiological Society of North America 99th Scientific Assembly and Annual Meeting(RSNA 2013)(2013.12.1-6. Chicago)

# 幹細胞研究部門

## 発生分化研究分野

### Department of Development and Differentiation

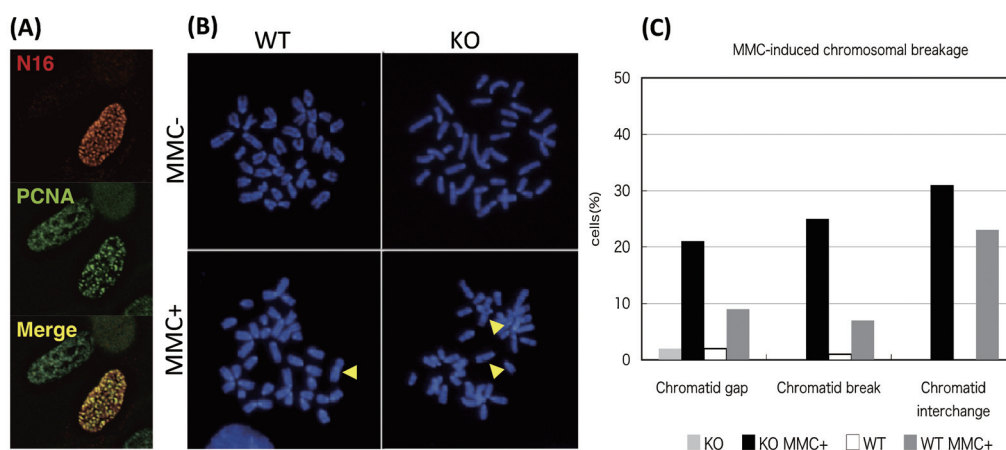
分野主任 教授 中辻 憲夫

Prof. Norio Nakatsuji

#### 【研究概要】

個体を構成する細胞系譜は全て一つの受精卵から多能性幹細胞、組織幹細胞等を経て成熟分化を行う。各種の体細胞はそれぞれ特異的な機能発現を行い生体の恒常性を維持する一方、生殖細胞は発生初期に多能性幹細胞から体細胞とは系譜が分かれ、配偶子形成プロセスを通じてゲノム情報の維持と再編、エピゲノム修飾の再構成等を行い、次の個体発生の為の遺伝プログラムを継承する。これら幹細胞-生殖細胞サイクルにおけるゲノム、エピゲノムプログラムは個体及び種が成立する根幹として厳密に制御される一方、その破綻は広範な疾患、例えば発生異常、遺伝病、癌、不妊等の病態の起因となる。当研究グループは幹細胞-生殖細胞の発生分化とゲノム-エピゲノム制御機構の特性解明、またその理解に基づく細胞-ゲノムの人為操作の技術基盤の創出を目指し、分子生物学、生化学、遺伝学、オミクス解析、また新たな実験系の開発を併せて研究を進めている。

(1) 生殖細胞のレトロトランスポゾン抑制とゲノム保護：生殖細胞に顕著に観察される構造的特徴に生殖顆粒 RNP 構造が挙げられる。我々はマウス生殖顆粒の特異的な構成分子をコードする tudor 関連 Tdrd 遺伝子群の機能解析を進めている。Tdrd 遺伝子群のノックアウトマウスを作製した所、これら遺伝子のホモ欠損個体はいずれも雄生殖細胞の分化に異常を示す事が明らかとなった。このうち TDRD1, 9 はマウス piwi ファミリー MILI, MIWI 2 と相互作用し、雄生殖幹細胞において piRNA 経路を介してレトロトランスポゾン LINE-1 の RNA、エピゲノム



DNA 複製複合体に局在する N16 は DNA クロスリンク修復に機能する。

(A) N16 蛋白質の強制発現により PCNA と明瞭な核内の共局在が観察される、(B, C) N16 ノックアウトマウス胚より樹立した ES 細胞では DNA 架橋剤であるマイトマイシン C (MMC) に対する染色体不安定性が増大する。

N16, a novel component of DNA replication complex, is essential for DNA crosslink repair in mice

(A) The N16 protein overexpressed in HELA cells clearly co-localizes with PCNA in the nucleus, (B, C) embryonic stem cells established from an N16 gene knockout mouse embryo show increased chromosome instability in response to DNA crosslinking reagent mytomycin C (MMC)



レベルでの抑制に機能する。一方、TDRD6, 7 は精子細胞の半数体成熟に働く。生殖顆粒は体細胞の processing body, stress granule 等と分子構成が類似しており、現在生殖細胞の RNA 制御、ストレス反応等について解析を進めている。(2)減数分裂を制御する誘導シグナルとクロマチン動態：幹細胞－生殖細胞サイクルにおいてゲノム情報の安定な継承は個体、種の成立に重要である一方、配偶子形成過程では減数分裂による1倍体化と相同遺伝子組換えによって遺伝情報の多様性が生まれる。減数分裂の制御機構の研究は主に酵母等の単細胞生物を用いて行われており、多細胞生物において詳細な分子基盤の解明は進んでいない。我々は精原幹細胞の樹立細胞株(GS細胞)を用いて体細胞型増殖から第1減数分裂前期を誘導する培養実験条件を作出した。この培養系を用いて減数分裂を促進および抑制するシグナル経路を同定し、分子から個体レベルでの詳細な研究を進めている。一方、減数分裂期のクロマチン制御やシグナル伝達の関与が推測される遺伝子群を蛋白質ドメイン構造、発現パターン、進化的保存等によりデータベースからスクリーニングしノックアウトマウス作成等による遺伝学的、生化学的解析を進めている。(3)幹細胞－生殖細胞の発生サイクルにおけるゲノム恒常性維持の分子ネットワーク：ES細胞は明確な分裂寿命が認められずゲノム損傷によるG1チェックポイントが観察されない。またES細胞のDNA変異率は他の体細胞と比べて低くDSB修復はHR経路がNHEJ経路よりも優位に利用され染色体不安定性のスペクトルはES細胞と分化体細胞とで異なる。これらES細胞と分化体細胞の相違はゲノム損傷応答の制御の違いによるものと考えられるがその分子機序は殆ど明らかになっていない。我々はES細胞やGS細胞のマルチオミクス解析を行う事で幹細胞－生殖細胞サイクルのゲノム維持機構、特にDNA損傷に対する修復ダイナミクスとクロマチン動態の分子ネットワーク解明を目指して研究を進めている。

The germline is the cell lineage that gives rise to full ontogenesis of individuals and transmits genetic information to next generations. During the differentiation of germ cells, important biological processes take place, such as epigenetic reprogramming, establishment of pluripotency and genetic DNA recombination. Our current research focuses on the molecular characterization of germinal granules/nuage, germline-specific ribonucleoprotein (RNP) assemblies in the cytoplasm, and the regulation of meiotic entry and chromatin dynamics.

One structural characteristic observed in the germline is a cytoplasmic RNP domain called germinal granules or nuage. The germinal granule/nuage is evolutionarily conserved in divergent animals, suggesting its essential and common role in the germline, but the precise molecular and physiological function(s) remains unclear. We are working on tudor-domain containing (Tdrd) genes, mainly Tdrd1, 6, 7 and 9, which encode for specific components of mammalian germinal granules/nuage. Gene-targeted disruption of Tdrd1, 6, 7 and 9 all led to male-specific sterility due to postnatal defects in spermatogenesis. Among these, TDRD1 and TDRD9 cooperate with piwi proteins, MILI and MIWI2, respectively, and function non-redundantly in retrotransposon silencing at RNA and epigenetic levels in spermatogonial stem cells and subsequent spermatogenesis. In contrast, Tdrd6 and 7 function in haploid spermiogenesis. Tdrd6 and 7 mutants show abnormal spermatid differentiation with aberrant chromatoid body architectures. Chromatoid bodies, a specialized form of germinal granules/nuage in spermatids, share some of their components with somatic processing bodies (p bodies), a form of RNP implicated in degradation or translational control of mRNA. We are addressing the possible function of TDRD6 and 7 in the regulation/metabolism of RNA.

Molecular mechanisms controlling meiotic entry and chromatin dynamics are important research subjects in cell and developmental biology. We previously showed that primordial germ cells autonomously enter into meiosis when cultured in vitro and identified a factor that suppresses this meiotic transition from mitosis. Recently, we es-



established another in vitro culture system that induces meiosis initiation of an established germline stem cell line derived from spermatogonia. By using this culture system, we identified signaling molecules that promote or inhibit meiosis from mitotic spermatogonial stem cells. We are undertaking biochemical and genetic characterization of these signaling pathways in vitro and in vivo.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Watatani, K., Xie, Z., Nakatsuji, N. and Sengoku, S. Global competencies from regional stem cell research : Bibliometrics for investigating and forecasting research trends. *Regen. Med.* 8, 659-668(2013).
- Kumagai, H., Suemori, H., Uesugi, M., Nakatsuji, N., Kawase, E. Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal. *Biochem Biophys Res Commun.* 434, 710-716(2013).
- Uosaki, H., Magadum, A., Seo, K., Fukushima, H., Takeuchi, A., Nakagawa, Y., Moyes, K.W., Narazaki, G., Kuwahara, K., Laflamme, M., Matsuoka, ., Nakatsuji, N., Nakao, K., Kwon, C., Kass, D.A., Engel, F.B., Yamashita, J.K. Identification of Chemicals Inducing Cardiomyocyte Proliferation in Developmental Stage-Specific Manner with Pluripotent Stem Cells. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 6, 624-633(2013).
- Miyazaki T., Nakatsuji, N., Suemori, H. Optimization of slow cooling cryopreservation for human pluripotent stem cells. *Genesis*(2013). DOI: 10.1002/dvg.22725
- Pandey RR, Tokuzawa Y, Yang Z, Hayashi E, Ichisaka T, Kajita S, Asano Y, Kunieda T, Sachidanandam R, Chuma S, Yamanaka S, Pillai RS. Tudor domain containing 12(TDRD12) is essential for secondary PIWI interacting RNA biogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 8; 110(41): 16492-7
- Lim AK, Lorthongpanich C, Chew TG, Tan CW, Shue YT, Balu S, Gounko N, Kuramochi-Miyagawa S, Matzuk MM, Chuma S, Messerschmidt DM, Solter D, Knowles BB. The nuage mediates retrotransposon silencing in mouse primordial ovarian follicles. *Development.* 2013 Sep; 140(18): 3819-25
- Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Daiba A, Chuma S, Katanaya A, Katsumata A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakamura T, Yoshinaga K, Asada N, Nakamura S, Yasunaga T, Kojima-Kita K, Itou D, Kimura T, Nakano T. GPAT2, a Mitochondrial Acyltransferase, in piRNA Biogenesis in Germline Stem Cells. *RNA* 2013 Jun; 19(6): 803-10
- Chuma S, Nakano T. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013 Jan 5; 368(1609): 20110338.

#### 2) 総説

- Nakatsuji, N. Mesoscopic science, where materials become life and life inspires materials. A great opportunity to push back the frontiers of life, materials, and biomaterials sciences(Editorial). *Biomater. Sci.* 1, 9-10(2013).
- Nakatsuji, N., Kawase, E., Miyazaki, T., Minami, I. and Aiba, K. Multidisciplinary research of human pluripotent stem cells for application to cell therapy and drug discovery. *Tiss. Engin. Regen. Med.* 10, 1-4(2013).

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

中馬新一郎 生殖幹細胞の増殖分化転換と核ダイナミクス連携新学術領域「ゲノムアダプテーション」班会議 (2013.5.30. 東京)

中馬新一郎 生殖幹細胞の減数分裂移行を制御するゲノム-エピゲノムプログラム新学術領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第一回班会議(2013.11.15. 京都)

望月綾子 The role of N16 in maintenance of DNA stability and recombination in mice 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」若手勉強会(2013.11.14. 大阪大学)

林 瑛理 遺伝子ノックアウトによる哺乳類配偶子形成関連遺伝子の機能解析 新学術領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」第一回若手勉強会(2013.11.14. 大阪)

林 瑛理 遺伝子ノックアウトによる哺乳類配偶子形成関連遺伝子の機能解析 平成 25 年度京都大学再生医科学研究所若手発表会(2013.12.25. 京都)

2) 講演・シンポジウム

Nakatsuji, N. Multidisciplinary research of human pluripotent stem cells : chemical control of cardiomyocyte differentiation and novel 3D culture system for large-scale production. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society(2013.3.15-17. Yokohama)

Nakatsuji, N. Multidisciplinary research of human pluripotent stem cells : chemical control of cardiomyocyte differentiation and novel 3D culture system for large-scale production. RSC Publishing-iCeMS Joint International Symposium : Cell-Material Integration and Biomaterials Science(2013.3.18-19. Kyoto)

Nakatsuji, N. Multidisciplinary research of human pluripotent stem cells : Creation of neurodegenerative disease model cells, chemical control of cardiomyocyte differentiation, and novel 3D culture system for large-scale production and application. Stem Cell & Regenerative Medicine Global Congress 2013(2013.3.27-29. Seoul)

中辻憲夫. 化合物や機能性マテリアルを用いたヒト多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)の学際研究. 第 62 回高分子学会年次大会(2013.5.29-31. 京都)

Nakatsuji, N. Novel culture system of human pluripotent stem cells for large-scale production and chemical control of cardiac differentiation. International Conference on Regenerative Biomedical Materials(2013.6.2-6. Wuhan)

中辻憲夫. 私が選んだ仕事としての科学と技術開発とイノベーション : 発生生物学の基礎科学から, 幹細胞の技術開発, そして産業活用イノベーション. 日本科学教育学会第 37 回年会(2013.9.6-8. 津)

Nakatsuji, N. Stem Cell Open Innovation in Japan : Industry-academia collaboration on stem cell large-scale production and quality control. World Stem Cell Summit 2013(2013.12.4-6. San Diego)

中馬新一郎 多能性幹細胞の大量/長期培養におけるゲノム情報の解析 NEDO 公開シンポジウム「再生医療の産業化を支える技術開発」BioJapan2013(2013.10.10. 横浜)

Chuma, S. piRNAs in the testis : mammalian tudor genes and germinal granules. International Congress of Andrology(2013.2. Melbourne, Australia)

## 胚性幹細胞研究分野 Department of Embryonic Stem Cell Research

分野主任 准教授 末盛 博文  
Assoc. Prof. Hirofumi Suemori

### 【研究概要】

#### ヒト ES 細胞株の樹立と臨床応用を目指した基盤研究

ヒト ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。これまでに 5 株のヒト ES 細胞株を樹立しうち 3 株は 2004 年 3 月から、2 株は 2009 年 4 月から分配を行っている。これまでに 50 件以上の研究計画に対して細胞株を分配し多くの研究成果が上げられている。

#### 細胞プロセッシング施設による臨床用ヒト ES 細胞バンクの構築

これまでに分配された十分な利用実績のあるヒト ES 細胞株を医薬品 GMP レベルで使用できるように動物由来成分を除去する「クリーンアップ」の条件検討を行うとともに、新たに医薬品 GMP レベルでのヒト ES 細胞株の樹立の準備に着手している。臨床レベルで使用するためのヒト ES 細胞株の樹立、培養、操作、品質保証、安全性確保等にわたる取扱基準規格を構築に関する協議を関係各局と行いつつ、将来の臨床用ヒト ES 細胞バンクの準備をすすめてきた。これと並行して、臨床応用に必要な動物由来成分を用いない完全合成培地、合成基質によるヒト ES 細胞の培養技術開発を行った。これらの研究開発の成果をもとにして、臨床用ヒト ES 細胞バンクを既存の ES 細胞のクリーンアップによる実証研究を行った。これらに加え、臨床用 ES 細胞バンクの品質管理を国際的な水準で実施するため、ISCBI(International Stem Cell Banking Initiative)による、基礎研究用 ES 細胞バンクに品質基準の策定に続き、臨床レベルでのバンキング品質基準の策定に寄与している。

#### 高効率かつ簡便なヒト多能性幹細胞の凍結保存法の開発

ヒト ES/iPS 細胞の凍結保存は従来ガラス化法が広く用いられてきた。ガラス化法による凍結は解凍後の細胞生存率が高いものの、操作法が煩雑であり作業者の熟練を要するため、個人差などにより安定した結果が得られない場合があった。このため古典的な細胞凍結法である緩慢凍結法での凍結保存法の開発が望まれていた。我々は、細胞の解離条件や播種密度を最適化することにより、緩慢凍結法においてもガラス化法と同等の効率で解凍後の生存率が得られる技法を開発した。この方法により幹細胞バンクなどで大量の細胞を凍結する工程を簡便かつ安定的に行えるようになる。

#### Establishment and analysis of human ES cell lines aiming clinical application

Embryonic stem (ES) cell lines are pluripotent stem cell lines which can be propagated indefinitely in culture retaining their differentiation potency into every cell types of tissues in the body. Since establishment of human ES cell lines were reported, clinical use of functional tissues and cells from human ES cells are expected. In Japan, there have been many demands for use of human ES cells on basic and pre-clinical researches. We started to establish human ES cell lines using donated frozen embryos in January 2003 and successfully established 5 human ES

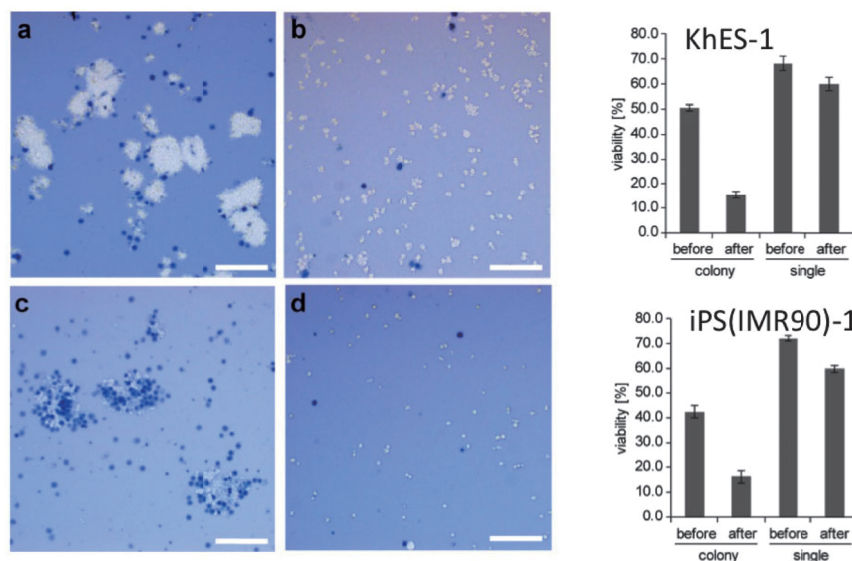


図1 ヒト ES 細胞の解離状態による凍結前後での生存率  
単一細胞への解離が解凍後の細胞の生存率を大きく向上させることが分かる。  
(Genesis. doi : 10.1002/dvg.22725 より改変)

cell lines. We have distributed these cell lines to over 50 researches.

#### Cell processing facility for banking of clinical grade human ES cell lines.

For clinical application of hES cells, several issues remain to be solved such as development of complete-defined culture medium and feeder-cell free substrates. To verify these factors we should establish a standard that reaches international levels. To achieve that purpose we have been working as a member of working groups of the International Stem Cell Forum (ISCF) and banking group of ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative). Recently the ISCBI established “Consensus Guidance for Banking and Supply of Human Embryonic Stem Cell Lines for Research Purposes” as a first fruit, and we are working to establish guidelines for clinical use of human ES cells.

#### Efficient and easy cryopreservation of human pluripotent stem cells by slow cooling.

Vitrification freezing has been widely used for cryopreservation of hPSCs. The vitrification method is efficient but requires intensive training of researchers. Conventional slow cooling method is ideal, but it leads to poor recovery of hPSCs after thawing. We demonstrated a highly efficient recovery method for hPSC cryopreservation by slow freezing and single-cell dissociation. hPSCs that were freeze-thawed as colonies showed markedly decreased survival, whereas freeze-thawed single hPSCs retained the majority of their viability, indicating that hPSCs should be cryopreserved as single cells. In addition, we found that freeze-thawed single hPSCs efficiently adhered and survived in the absence of a ROCK inhibitor by optimization of the seeding density.

This simplified but highly efficient cryopreservation method allows easy handling of cells and bulk storage of high-quality hPSCs.

## 【業績目録】

## ◆ 誌上発表 ◆

## 1) 原著論文

Miyazaki T, Nakatsuji N, Suemori H. Optimization of slow cooling cryopreservation for human pluripotent stem cells. *Genesis*. 2013 Nov 19, in press

Kumagai H, Suemori H, Uesugi M, Nakatsuji N, Kawase E. Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 May 17; **434**(4): 710-6. 2013.

Takase O, Yoshikawa M, Idei M, Hirahashi J, Fujita T, Takato T, Isagawa T, Nagae G, Suemori H, Aburatani H, Hishikawa K. The role of NF- $\kappa$ B signaling in the maintenance of pluripotency of human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. **8**(2): e56399. 2013.

## 2) 総説

Nakatsuji, N., Kawase, E., Miyazaki, T., Minami, I., Aiba, K. Multidisciplinary Research of Human Pluripotent Stem Cells for Application to Cell Therapy and Drug Discovery. *TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE* 10, 160-163.2013.

川瀬栄八郎, 宮崎隆道, 関口清俊 実験医学 4月号(カレントトピックス)「ラミニン E8 を用いた安全で効率的なヒト多能性幹細胞培養法の開発」 31, 918-922.2013.

## ◆ 学会等の講演 ◆

## 1) 学会・研究会発表

宮崎隆道, 二木杉子, 末盛博文, 谿口征雅, 山田雅司, 川崎美和, 林麻利亜, 熊谷英明, 中辻憲夫, 関口清俊, 川瀬栄八郎 ラミニン E8 フラグメントを用いたヒト ES/iPS 細胞の単一分散培養法 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3.21-23)

武内大輝, 中辻憲夫, 末盛博文 ヒト多能性幹細胞からインスリン産生細胞への分化誘導方法の構築 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3.21-23)

大田明生, 松村和明, 末盛博文, 李 浚載, 角 昭一郎, 玄 丞休 ヒト ES, 及び iPS 細胞の緩慢凍結法のためのポリ-L-リジン誘導体凍結保存剤の開発 第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3.21-23)

Akemi Ota, Kazuaki Matsumura, Hirofumi Suemori, Shoichiro Sumi and Suong-Hyu Hyon. An Effective Verification Of Antifreeze Polyamino-Acid For A Slow Cryopreservation Of Human iPS Cell And ES Cell ISSCR (国際幹細胞学会 第 11 回年次大会) (2013.6.12-15)

Nao Hirata, Masato Nakagawa, Yuto Fujibayashi, Kaori Yamauchi, Asako Murata, Itsunari Minami, Maiko Tomioka, Takayuki Kondo, Ting-Fang Kuo, Hiroshi Endo, Haruhisa Inoue, Shin-ichi Sato, Shin Ando, Yoshinori Kawazoe, Kazuhiro Aiba, Koh Nagata, Eihachiro Kawase, Young-Tae Chang, Hirofumi Suemori, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Shinya Yamanaka, Norio Nakatsuji, Kazumitsu Ueda, and Motonari Uesugi. Fluorescent Chemical Probes for Human Stem Cells. 2013 Cira International Symposium (Kyoto, 2013.3.11)



## 2) 講演・シンポジウム

Kawase E., Applications of scalable culture system toward for clinical-graded undifferentiated human embryonic stem cells. 2013 UST-Kyoto iCeMS International Symposium (National Chiao Tung University, 2013.11.18-19).

## 幹細胞分化制御研究分野 Department of Stem Cell Differentiation

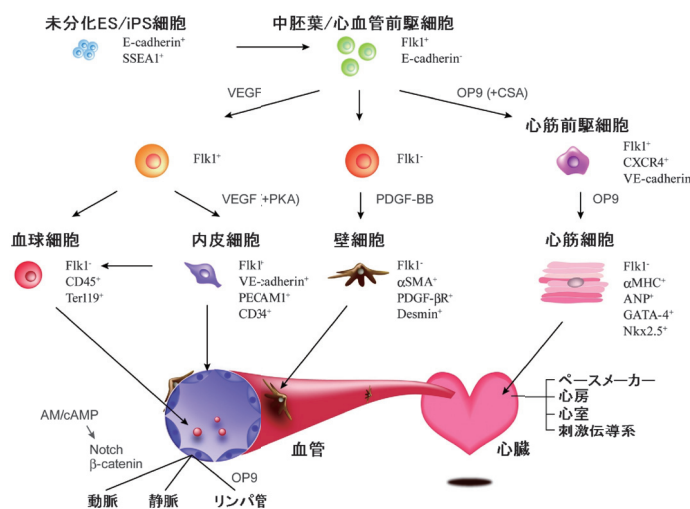
分野主任 教授 山下 潤

Prof. Jun K. Yamashita

### 【研究概要】

幹細胞分化制御研究領域では、ES 細胞(胚性幹細胞: embryonic stem cells)及び iPS 細胞(人工多能性幹細胞: induced pluripotent stem cells)を用いて、心血管系の細胞分化・再生に関する研究を行っている。

ES 細胞は、全ての種類の細胞に分化することができるいわゆる「万能」幹細胞と考えられている。この全能性(pluripotency)を in vitro において引き出し、分化誘導した細胞を再生治療に用いようとする試みが様々な臓器、細胞をターゲットに行われている。我々は、ES 細胞を用いて中胚葉由来組織である血管および心臓の分化研究を行ってきた。



血管は、内腔を一層におおう内皮細胞とそれを外から取りまく壁細胞の2種類の細胞からなっている。その中を流れる血球細胞を含めてこれら血管構成細胞は互いに密接に関連しあい血管を形作る。VEGFの受容体の一つであるFlk1は血球・血管系細胞の最も早期の分化マーカーおよび中胚葉のマーカーと考えられている。我々は、ES細胞を用いてin vitroにおいて中胚葉、さらには血管の構成細胞である血管内皮細胞と壁細胞(血管平滑筋細胞およびペリサイト)を選択的に分化誘導し、最終的に血

管としての高次構造を in vitro および in vivo において構築すること、いわば血管の発生過程を再現することに成功した(Yamashita, *Nature*, 2000.)。この in vitro 分化系では、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、内皮細胞、壁細胞、血球細胞が分化し、さらにそれらの細胞が血管としての高次構造を形成する。また、中胚葉由来の細胞の一つである心筋細胞も同様に Flk1 陽性細胞から分化誘導することと共に新しい心筋前駆細胞の同定に成功している(Yamashita, *FASEB J*, 2005)。動静脈リンパ管内皮細胞分化や心筋ペースメーカー細胞などさらに多様な心血管細胞の分化誘導を行っている(Yamashita, *Trends Cardiovasc Med*, 2007; Yanagi, *Stem Cells*, 2007 他)(図)。最近我々は、免疫抑制剤のサイクロスポリン A が Flk1 陽性中胚葉細胞に特異的に作用し、心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化を促進する、という全く新しい作用を見出した(Yan, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009)。本研究をもとに心筋細胞の効率的分化を誘導する低分子化合物の探索を行っている。これら技術と細胞シート作製技術(東京女子医科大学)を組み合わせ、心筋梗塞重急性期における心臓細胞シート移植の効果と作用機構を明らかにした(Masumoto, *Stem Cells*, 2012)。また、血管内皮細胞分化を培養下において構成的に再現することにより、cAMP シグナルの意義を次々に明らかにした。すなわち、Protein kinase A が血管前駆細胞の VEGF への感受性を変化させて内皮細胞分化を促進していること(Yamamizu, *Blood*, 2009)、同作用が CREB による転写因子 Etv2 発現誘導

によること (Yamamizu, **Stem Cells**, 2012), 痛覚に関与するオピオイドが cAMP シグナルを抑制することにより内皮分化・血管形成に抑制的に作用していること (Yamamizu, **Blood**, 2011 表紙), 及び Notch と  $\beta$ -catenin が直接相互作用することにより動脈内皮への運命決定を行っていることを新たに示した (Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010). また PKA シグナルの幹細胞分化早期における意義を検討し, PKA がヒストン H3 メチル化酵素 G9a の発現を増加させることにより, Oct4 など未分化遺伝子への負のヒストン修飾 (リジン 9 ジメチル化) を促進し, 細胞分化を早めることを示し, シグナルとエピゲノム制御の新しい連関とそれによる分化タイミングの制御機構を明らかにした (Yamamizu, **Cell Stem Cell**, 2012).

さらに, 最近本研究所山中伸弥教授によって樹立された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いて同様の実験システムを構築し, 新たな心血管再生研究を開始している. ES 細胞研究において蓄積したノウハウを用いていち早くマウス iPS 細胞を用いた心血管系細胞の分化誘導に成功した (Narazaki, **Circulation**, 2008). またサイクロスポリン A の作用を応用し, ヒト iPS 細胞からの機能心筋細胞を誘導することにも成功した (Fujiwara, **PLoS One**, 2011). さらに高効率な新しいヒト iPS 細胞の心筋分化法と誘導心筋細胞の純化法の開発にも成功した (Uosaki, **PLoS One**, 2011).

このように我々の ES 細胞を用いた in vitro 分化系は, 種々の循環器系の細胞群を系統的に分化誘導することができ, 心血管の発生分化過程を培養下に恣意的に操作しながらしかも経時的に観察できる. 従って, この分化系を用いることにより心臓血管の発生分化のメカニズムを細胞レベル, 分子レベルで検討し, ノックアウトマウスの形質解析に依存していた分化の分子機構の解析を in vitro で行うという新しいアプローチが可能になったと考えられた. またこれらの知見を様々な形で再生医療を中心とした応用研究に展開することができる.

現在, この ES 細胞 in vitro 分化系を用いて, 以下のようなプロジェクトを遂行している.

#### 1. ES 細胞/iPS 細胞 in vitro 分化系を用いた心血管細胞分化多様化の分子機構の解析

- 1) 動静脈・リンパ管内皮特異的分化誘導と内皮細胞多様化機構の解析 (Yurugi-Kobayashi, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006; Kono, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006; Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007; Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010)
- 2) cAMP 及び PKA による血管内皮細胞の分化能調節機構 (Yamamizu, **Blood**, 2009; Yamamizu, **Stem Cells**, 2012)
- 3) 血管内皮分化/血管形成及び腫瘍形成におけるオピオイドの意義 (Yamamizu, **Blood**, 2011 表紙) (星薬科大学との共同研究)
- 4) ES/iPS 細胞分化過程におけるエピジェネティクス制御機構の関与と意義 (Yamamizu, **Cell Stem Cell**, 2012) (東京大学との共同研究)
- 5) ES/iPS 細胞分化系における新しい遺伝子機能解析システムの開発
  - i) 誘導性 shRNA を用いた分化段階特異的遺伝子発現制御 ES 細胞システム (Hiraoka-Kanie, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006)
  - ii) CRISPR/Cas9 を用いたプロモーター挿入法による簡便な遺伝子欠損/レスキューシステム (Matsunaga, **Biochem Biophys Res Commun**, 2014)

#### 2. ES 細胞/iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導と再生治療応用

- 1) 2 次元培養による新しい ES 細胞からの心筋細胞分化誘導法の開発と新しい心筋前駆細胞の同定 (Yamashita, **FASEB J**, 2005).
- 2) 心筋細胞 in vitro 分化系を用いた心筋分化・多様化の分子機構の解析

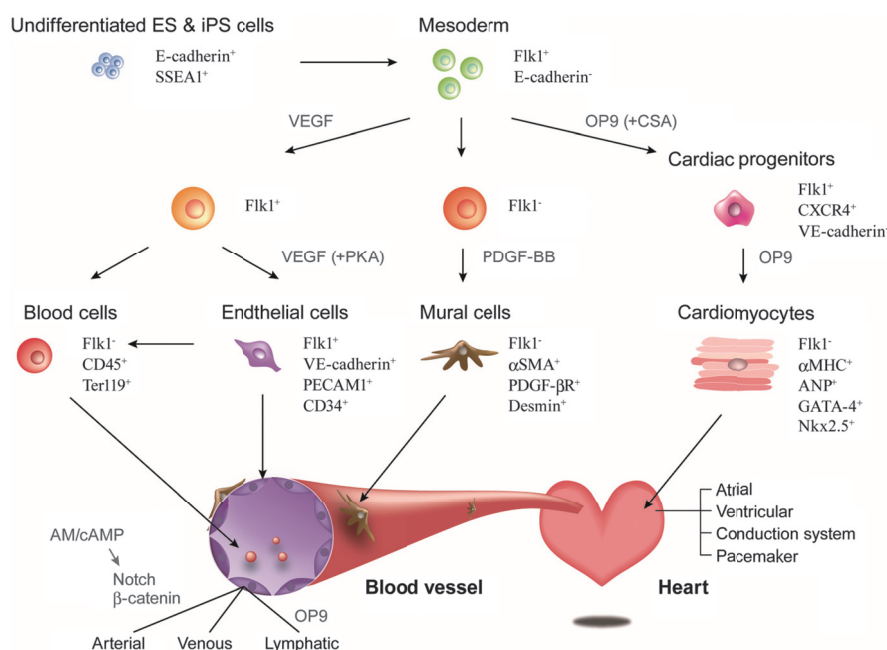
- 3) ES 細胞由来心筋細胞自動能形成機構の解析 (Yanagi, **Stem Cells**, 2007)
- 4) サイクロスポリン A を用いた新しい高効率心筋前駆細胞・心筋細胞分化誘導法 (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009; Fujiwara, **PLoS One**, 2011) (京都大学心臓血管外科・内分泌代謝内科との共同研究)
- 5) ヒト ES 細胞からの心血管細胞分化誘導  
 ヒト ES 細胞使用計画「ヒト ES 細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究」(研究代表者・山下 潤, 平成 17 年 3 月 10 日文科科学大臣承認)  
 ヒト ES 細胞を用いた心血管分化研究を行っている.
- 6) iPS 細胞を用いた心血管分化再生に関する研究
  - i) マウス iPS 細胞からの心血管細胞分化系 (Narazaki, **Circulation**, 2008; **Best Paper Award** in Basic Science category, *Circulation* 2008)
  - ii) 新しい高効率ヒト心筋分化誘導法の開発と VCAM1 を表面抗原として用いた新しい心筋細胞純化法の開発 (Uosaki, **PLoS One**, 2011)
  - iii) iPS 細胞由来心臓細胞シートを用いた細胞移植治療の開発 (Masumoto, **Stem Cells**, 2012) (東京女子医大・京都大学心臓血管外科との共同研究)
  - iv) ヒト iPS 細胞分化における心筋前駆細胞の誘導と純化
- 7) iPS 細胞分化システムのケミカルバイオロジー及び創薬応用 (Nakao, **Bioorg Med Chem Lett**, 2008) (早稲田大学他との共同研究)
- 8) 心筋細胞分化・増殖を促進する新しい化合物の探索・同定
  - i) 分化段階特異的に心筋細胞増殖を制御する低分子化合物 (Uosaki, **Circ Cardiovasc Genet**, 2013).

**Main theme of our research:** Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular development and the application to cardiovascular regeneration using *in vitro* differentiation system of embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells.

Previously, we established a novel *in vitro* vascular differentiation system of ES cells (Yamashita, **Nature**, 2000). Using ES cell-derived Flk1 (VEGF receptor-2)-positive mesodermal cells as starting material, we can induce all of the vascular cellular compartments, that is, endothelial cells, mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) and blood cells. Vessel-like structures of endothelial cell tube with mural cell attachment and blood cell inside are formed from Flk1+ cell aggregates in 3-D culture. Thus, this *in vitro* system should reproduce the early process of vascular development. And we also demonstrated that the transplanted vascular cells induced by this system could contribute to developing vasculature *in vivo*. Moreover, we have succeeded in inducing cardiomyocytes from Flk1+ cells, and identifying a novel cardiac progenitor cells (Yamashita, **FASEB J**, 2005). Recently, we succeeded in inducing arterial, venous, and lymphatic endothelial cells (Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007 etc). All of cardiovascular cellular components, thus, could be induced in our *in vitro* differentiation system. (Fig. 1). Recently, we found that an immunosuppressant, cyclosporin-A, possesses a novel effect to potentially induce cardiomyocytes and cardiac progenitors from Flk1+ mesoderm cells (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009). Currently, we are screening to identify small molecules which can induce efficient cardiomyocytes from pluripotent stem cells and could be effective for cardiac regeneration *in vivo*. Combining our technologies in stem cells and a cell sheet

method (Tokyo Women's Medical University), we generated a cardiac cell sheet with defined cardiac cell populations (i.e. cardiomyocytes, endothelial cells, and vascular mural cells), and succeeded in showing potent restoration effect on infarcted hearts after sheet transplantation (Masumoto, **Stem Cells**, 2012). Using our constructive induction system for vascular cells, we recently demonstrated critical roles of cAMP/PKA signaling in endothelial cell differentiation and diversification. That is, protein kinase A (PKA) enhances vascular progenitor potential to endothelial competent through dual upregulation of VEGF receptors, Flk1 and neuropilin1, in Flk1<sup>+</sup> cells (Yamamizu, **Blood**, 2009). This effect is mediated by CREB-induced gene expression of an Ets family transcription factor, Etv2 (Yamamizu, **Stem Cells**, 2012). A neurophysiological modifier, opioid system, is found to regulate endothelial cell differentiation and early vascular formation through inhibition of cAMP/PKA pathway (Yamamizu, **Blood**, 2011; cover image). We also demonstrated that Notch and  $\beta$ -catenin directly interact in Flk1<sup>+</sup> cells and determine arterial endothelial cell fate (Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010). We further examined new roles of PKA signaling in the earlier stage of differentiation from pluripotent stem cells, and demonstrated a novel signal-epigenome linkage that regulated timing of pluripotent stem cell differentiation. That is, activation of PKA induced rapid differentiation of germ layer cells from the pluripotent state by increasing protein expression of a histone methyltransferase, G9a, which suppressed pluripotent gene expressions through a negative histone modification, H3K9me2 (Yamamizu, **Cell Stem Cell**, 2012).

Recently, we have started new research with the use of novel adult tissue derived pluripotent stem cells, induced pluripotent stem (iPS) cells, and succeeded in systematic cardiovascular cell differentiation of mouse iPS cells (Narazaki, **Circulation**, 2008). We recently succeeded in inducing functional cardiomyocytes from human iPS cells using cyclosporin-A method (Fujiwara, **PLoS One**, 2011). We further succeeded in efficiently inducing cardiomyocytes from human iPS cells and identifying a cell surface molecule, VCAM1, for purification of cardiomyocytes (Uosaki, **PLoS One**, 2011).



**Fig. 1 : Cardiovascular development in ES and iPS cell *in vitro* differentiation**



In this system, we can manipulate the fate of cell differentiation, observe the behavior of differentiating cells, purify and obtain cells at various differentiation stages. This system provides us possibilities to dissect the mechanisms of cardiovascular development from new aspects, and offers novel potentials for cardiovascular regeneration.

#### Research Projects :

##### 1. Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular cell differentiation and specification using ES/iPS cell *in vitro* differentiation system.

- 1) Specific induction of various endothelial cells types (i.e., arterial, venous, and lymphatic) and investigation of the mechanisms for endothelial specification (Yurugi-Kobayashi, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006 ; Kono, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006 ; Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007 ; Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010).
- 2) PKA in the regulation of vascular progenitor potential (Yamamizu, **Blood**, 2009 ; Yamamizu, **Stem Cells**, 2012)
- 3) Significance of opioids in endothelium differentiation, vascular formation, and tumor growth (Yamamizu, **Blood**, 2011 ; cover image) (collaboration with Hoshi University)
- 4) Significance of epigenome regulation in pluripotent stem cell differentiation processes, mainly with global analyses of epigenetics in ES/iPS cell differentiation (Yamamizu, **Cell Stem Cell**, 2012) (Collaboration with University of Tokyo)
- 5) Gene manipulation systems in ES/iPS differentiation
  - i) Inducible shRNA expression for differentiation stage-specific gene knockdown (Hiraoka-Kanie, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006)
  - ii) Gene knockout/rescue system by promoter insertion with CRISPR/Cas9 (Matsunaga, **Biochem Biophys Res Commun**, 2014)

##### 2. Cardiovascular cell induction from ES/iPS cells and application to regeneration

- 1) Establishment of a novel cardiomyocyte induction system in 2-dimensional culture (Yamashita, **FASEB J**, 2005).
- 2) Dissection of cellular and molecular mechanisms of cardiomyocyte differentiation
- 3) Ion channels to reconstitute automaticity of ES cell-derived cardiomyocytes (Yanagi, **Stem Cells**, 2007)
- 4) Specific and efficient expansion of cardiac progenitor cells and cardiomyocytes by cyclosporin-A (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009 ; Fujiwara, **PLoS One**, 2011) (collaboration with Department of Cardiac Surgery, and Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine)
- 5) Cardiovascular cell differentiation using human ES cells
 

Our human ES cell research project “Research for differentiation mechanisms of cardiovascular cell differentiation using human ES cells” has been approved by the Science Ministry of Japan (2005.3.10).
- 6) Cardiovascular regeneration with iPS cell research
  - i) Establishment of cardiovascular cell differentiation system of mouse iPS cells (Narazaki, **Circulation**, 2008 ; **Best Paper Award** in Basic Science category, **Circulation** 2008).

- ii) Novel efficient cardiomyocyte induction and purification method with VCAM1 (Uosaki, **PLoS One**, 2011)
- iii) Cell sheet transplantation strategies with iPS cell-derived cardiac cell population. (Masumoto, **Stem Cells**, 2012) (Collaboration with Tokyo Women's Medical University)
- iv) Induction and purification of cardiac progenitors from human iPS cells
- 7) Application of iPS cell differentiation system to chemical biology and drug screening (Nakao, **Bioorg Med Chem Lett**, 2008) (Collaboration with Waseda University)
- 8) Screening and identification of small molecules for cardiomyocyte differentiation and proliferation
  - i) Small molecules controlling developmental stage-specific cardiomyocyte proliferation (Uosaki, **Circ Cardiovasc Genet**, 2013)

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 原著論文

(\* corresponding author)

- Uosaki H\*, Magadum A, Seo K, Fukushima H, Takeuchi A, Nakagawa Y, Moyes KW, Narazaki G, Kuwahara K, Laflamme M, Matsuoka S, Nakatsuji N, Nakao K, Kwon C, Kass DA, Engel FB, Yamashita JK\*. Identification of chemicals inducing cardiomyocyte proliferation in developmental stage-specific manner with pluripotent stem cells. **Circ Cardiovasc Genet**, 6 : 624-633, 2013. doi : 10.1161/CIRCGENETICS.113.000330
- Yamamizu K, Furuta S, Hamada Y, Yamashita A, Kuzumaki N, Narita M, Doi K, Katayama S, Nagase H, Yamashita JK, Narita M.  $\kappa$  Opioids inhibit tumor angiogenesis by suppressing VEGF signaling. **Sci Rep**, 3 : 3213, 2013. doi : 10.1038/srep03213.
- Kito T, Shibata R, Ishii M, Suzuki H, Himeno T, Kataoka Y, Yamamura Y, Yamamoto T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Tanigawa T, Yamashita JK, Ouchi N, Honda H, Isobe K, Murohara T. iPS cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for reparative angiogenesis. **Sci Rep**, 3 : 1418, 2013.

#### 英文総説

- Masumoto H, Yamashita JK\*. Strategies in cell therapy for cardiac regeneration. **Inflammation and Regeneration**, 33 : 114-120, 2013. Doi : 10.2492/inflammregen.33.114
- Masumoto H\*, Yamashita JK. Pluripotent stem cells for cardiac cell therapy : the application of cell sheet technology. **Pluripotent Stem Cells**, ISBN 978-953-51-1192-4, InTech, 2013. Doi : 10.5772/56326

#### 和文総説

- 山下 潤. 「ES・iPS細胞からの血管細胞への分化」月刊循環器・特集「循環器再生医療の現状と展望」(福田恵一・編)p14-p22, 2013. 医学出版
- 山下 潤. 「内分泌代謝領域の再生医学」最新内分泌代謝学(中尾一和・編)p52-p54, 2013. 診断と治療社
- 山下 潤. 「血管を構成する細胞系譜とその分化」血管新生研究の最前線(佐藤靖史, 高倉伸幸・編)p22-p33, 2013. 医薬ジャーナル社

山下 潤. 「心筋再生医療」 Annual Review 循環器 2013, p41-p50. 中外医学社

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- 升本英利. ヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植による虚血性心疾患治療の可能性についての基礎的検討. 第 9 回宮崎サイエンスキャンプ. 2013.2.16. 宮崎 ‘優秀ポスター賞’
- Masumoto H. The Transplantation of Human iPS Cell-Derived Cardiac Cell Sheets to Rat Myocardial Infarction Model Ameliorates Cardiac Dysfunction Through Neovascularization. The 21st Annual Meeting of The Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (ASCVTS2013). 2013.4.7. Kobe, Japan
- Masumoto H. Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Engineered Tissue Sheets with Defined Cardiovascular Cell Populations for Infarcted Rat Hearts. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 11th Annual Meeting. 2013.6.14. Boston, USA
- Takeda M, Yamashita JK. hiPS cell-derived cardiac progenitor cells for cardiac regeneration (poster). ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 11th Annual Meeting. 2013.6.14. Boston MA, USA.
- Takeda M, Yamashita JK. hiPS cell-derived cardiac progenitor cells for cardiac regeneration (poster). The 2<sup>nd</sup> Retreat of Center for iPS Cell Research and Application (CiRA). 2013.3.13. Shiga, Japan.
- 松永太一. RSK4 による新しい血管内皮細胞の分化制御機構. 第 12 回日本再生医療学会. 2013.3.21. 横浜
- Matsunaga T. RSK4 suppresses endothelial cell fate through direct inhibition of PKA activity (poster). ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 11th Annual Meeting. 2013. 6. 12. Boston, USA. ‘Travel Award’
- 松永太一. 内皮細胞の分化制御機構における RSK4 の役割. 第 33 回日本炎症・再生医学会. 2013.7.3. 京都 ‘最優秀ポスター賞受賞’
- 松永太一. RSK4 による内皮細胞分化の新規抑制機構. 第 4 回 Molecular Cardiovascular Conference II. 2013.9.7. 小樽
- 松永太一. 内皮細胞分化における RSK4 の役割. 第 21 回日本血管生物医学会学術大会. 2013.9.26. 豊中
- 松永太一. Crispr/Cas9 を用いたプロモーター配列挿入による簡便な誘導性遺伝子過剰発現系の構築とその幹細胞研究応用. 第 13 回日本再生医療学会. 2014.3.4. 京都
- 福島弘之. Identification of novel chemicals potently inducing cardiomyocytes from various progenitor populations. 第 1 回 IRG (Inflammation and Regeneration) Meeting. 2013.1.11-12. 東京
- 福島弘之. 多能性幹細胞からの心筋細胞分化誘導を促進する新規低分子化合物の同定. 2013.3.21-23. 第 12 回日本再生医療学会総会. 横浜
- Fukushima H. Novel small molecules promoting cardiomyocyte differentiation from murine and human cardiac progenitor populations. ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 11th Annual Meeting. 2013.6.12-15. Boston, USA
- 福島弘之. 多能性幹細胞分化システムを用いた新しい心筋分化誘導化合物の探索. 第 4 回 Molecular Cardiovascular Conference II. 2013.9.6-8. 小樽 (Poster Session Award 受賞)
- Fukushima H. Novel small chemicals potently enhance cardiomyocyte differentiation from pluripotent stem cells. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences. 2014.1.16-18. Osaka, Japan

- 福島弘之. 多能性幹細胞システムを用いた新規心筋分化誘導化合物の同定, 2014.3.4-6, 第13回日本再生医療学会総会, 京都
- 福島弘之. Novel Small Compounds Potently Induce Cardiomyocytes from Various Progenitor Populations, 2014.3.21-23, 第78回日本循環器学会学術総会, 東京
- 松尾武彦, 升本英利, 丸井 晃, 南方謙二, 池田 義, 坂田隆造. 口演(成人心臓23). 多能性幹細胞由来心臓組織様シートの効果的積層化は移植細胞の生着効率を改善し心筋梗塞後の心機能低下を抑制する. 第66回日本胸部外科学会定期学術集会. 2013.10.16-19. 仙台市
- 松尾武彦, 升本英利, 丸井 晃, 池田 義, 坂田隆造. 一般講演. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞および血管構成細胞含有細胞シート移植による虚血性心疾患治療についての検討. 第12回再生心臓血管外科治療研究会. 2013.2.25. 東京.
- Matsuo T., Masumoto H., Tajima S., Marui A., Ikeda T., Tabata Y., Sakata R., and Yamashita JK.. Poster Session 2. An efficient piling up of pluripotent stem cell-derived cardiac tissue-like sheets that robustly promotes cell engraftment and ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction. ESC Congress2013. 2013.8.31-9.4. Amsterdam, Netherlands.
- Matsuo T., Masumoto H., Tajima S., Marui A., Minakata K., Ikeda T., Tabata Y., Sakata R., and Yamashita JK. Efficiently Piled-Up Cardiac Tissue-Like Sheets With Pluripotent Stem Cell-Derived Cells Robustly Promotes Cell Engraftment and Ameliorates Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction. American Heart Association (AHA). 2013.11.16-20. Texas, U.S.A.
- Ikuno T, Masumoto H, Marui A, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK. Efficient and Scalable Endothelial Cell Differentiation Method from Human Induced Pluripotent Stem Cells Based on 2-D Monolayer and Serum-Free Culture. ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 11th Annual Meeting. 2013.6.14. Boston, U.S.A.
- 幾野 毅. ヒト人工多能性幹(iPS)細胞からの効率的な内皮細胞分化誘導法. 第34回日本炎症再生医学会. 2013.7.2. 京都
- Ikuno T, Masumoto H, Marui A, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK. Efficient endothelial cell differentiation protocol from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture for realization of vascular regenerative medicine. Rapid Fire - Remodelling the vessel wall. ESC Congress2013. 2013.9.3. Amsterdam, Netherlands.
- 幾野 毅. ヒト人工多能性幹(iPS)細胞からの効率的かつ高収量な内皮細胞分化誘導法. 第4回 Molecular Cardiovascular Conference II. 2013.9.7. 北海道.
- 幾野 毅. 無血清二次元単層培養によるヒト iPS 細胞からの高効率高収量な内皮細胞分化誘導法. 第21回日本血管生物医学会学術集会. 2013.9.27. 大阪
- 幾野 毅. ヒト iPS 細胞を用いた二次元単層培養による効率的な内皮細胞分化誘導法. 第66回日本胸部外科学会定期学術集会. 2013.10.19. 仙台

## 2) 講演・シンポジウム

- 山下 潤. 「多能性幹細胞を用いた心血管再生への多面的アプローチ」田辺三菱製薬特別講演会. 2013.1.23. 東京
- 山下 潤. 「ES/iPS細胞を用いた多面的再生治療戦略ー心臓や血管のリニューアルは可能か?ー」Basic & Clinical Pulmonary Hypertension Conference (特別講演)2013.2.9. 神戸

- 山下 潤. 「多能性幹細胞からの心血管細胞の誘導・純化・組織再構成」医薬品・医療機器等レギュレトリーサイエンス総合研究事業・公開シンポジウム. 2013.2.14. 東京
- 山下 潤. 「ES/iPS 細胞を用いた多面的心血管再生戦略」宮崎サイエンスキャンプ. 2013.2.16. 宮崎
- 山下 潤. 「多能性幹細胞を用いた心血管再生への多面的戦略－ケミカルバイオロジー的アプローチと創薬研究を中心に－」FBT Symposium. 2013.3.6. 東京
- Yamashita JK. Integrative Approaches for Cardiac Regeneration with ES & iPS Cells, Small Molecules, and Cell Sheet Technology. 第 77 回日本循環器学会 Prenary Session 5.: New Advance in Cardiac Regenerative Medicine –Basic Research and Clinical Trial- 2013.3.15. 横浜
- 山下 潤. 「ES 細胞/iPS 細胞を用いた心血管分化研究とその応用」安全性評価研究会(特別講演). 2013.4.13. 大阪
- 山下 潤. 「ES 細胞・iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究」愛知 Rising Force Meeting(特別講演). 2013.5.29. 名古屋
- 山下 潤. 「ドキドキに、ドキドキ。－心臓の再生に挑戦する－」CiRA カフェ. 2013.6.1. 京都
- 山下 潤. 「多能性幹細胞分化システムを用いた心臓再生治療薬の探索」日本炎症再生医学会シンポジウム「疾患 iPS 細胞と創薬」(オーガナイザー). 2013.7.2. 京都
- 山下 潤. 「ES 細胞/iPS 細胞を用いた多面的心臓再生治療戦略の開発」岐阜心不全研究会(特別講演). 2013.7.4. 岐阜
- 山下 潤. 「多能性幹細胞を用いて多面的に心臓再生に挑戦する」京都大学附置研究所・品川セミナー. 2013.7.5. 東京
- Yamashita JK. Multiple and integrative approaches to cardiovascular diseases with stem cell technology. International Conference on Endothelin 2013(Special Guest Session). 2013.9.10. 東京
- Yamashita JK. Vascular cell differentiation and tissue regeneration. 第 86 回日本生化学会国際シンポジウム「血管・リンパ管の発生・形成機構とシグナル伝達」2013.9.12. 横浜
- 山下 潤. 「多能性幹細胞を用いた新しい心不全治療実現に向けた多面的アプローチ」福岡心不全研究会(特別講演) 2013.9.17. 福岡
- 山下 潤. 「多能性幹細胞からの内皮細胞分化とその応用」日本血管生物医学会シンポジウム. 2013.9.26. 大阪
- 山下 潤. 「ES 細胞・iPS 細胞を用いた多面的心臓再生治療戦略の開発」奈良県立医科大学祭シンポジウム. 2013.10.26. 橿原
- 山下 潤. 「多能性幹細胞を用いた多面的心血管再生治療戦略の開発」日本心血管内分泌代謝学会シンポジウム. 2013.11.23. 大阪
- 山下 潤. 「多能性幹細胞を用いた心血管分化再生に関する多面的研究」徳島脈管研究会(特別講演). 2013.11.27. 徳島
- 山下 潤. 「iPS 細胞を用いた種々の心臓細胞の誘導と再生細胞治療及び病態モデル応用」日本科学技術振興機構新技術説明会. 2013.12.2. 東京
- Masumoto H. Strategy for cardiac regeneration based on human iPS cell-Engineered tissue sheet technology. Kosair Charities Pediatric Heart Research Program, Cardiovascular Innovation Institute, University of Louisville. 2013.1.23 Louisville, Kentucky, USA
- 升本英利. 「再生医学研究が変える外科の近未来」細胞シート技術を用いた多能性幹細胞による心筋再生研究機能的再生から組織再生へ. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013.4.11. 福岡



## 幹細胞加工研究分野 Department of Stem Cell Engineering

分野主任 准教授 多田 高

Assoc. Prof. Takashi Tada

### 【研究概要】

#### 背景)

受精から始まる個体発生は、たった一個の細胞の細胞分裂による数十兆個への増殖と共に、巧妙に制御された細胞分化によってもたらされる。この過程で、受精卵は、体を形つくる全ての種類の細胞に分化可能な多能性が失われ、限られた役割を果たすべく特殊化した細胞へと分化そして老化してゆく。一般に、分化は後戻りのできないプロセスとの概念が固定されていた。我々は、多能性幹細胞(pluripotent stem cell)の一種である胚性幹(ES)細胞と体細胞を細胞融合すると、体細胞核ゲノムのエピジェネティクスが書き換えられ未分化細胞様に再プログラム化されることを世界に先駆けて発見した(Tada et al. (2001)Curr. Biol. )。この結果は、分化細胞を直接培養条件下で多能性幹細胞に再プログラム化可能であること、また ES 細胞には体細胞の再プログラム化に必要な十分な因子があることを示していた。現在では、ES 細胞から同定された因子(Oct4, Sox2, Klf4 & c-Myc)の強制発現により体細胞が多能性幹細胞(人工多能性幹(iPS; induced pluripotent stem)細胞)に再プログラム化されることが明らかになっている(Takahashi & Yamanaka(2006)Cell)。体細胞の多分化能の獲得には Oct4,Sox2,Nanog が鍵となる転写因子として考えられているが、再プログラム化機構は未だ解き明かされていない。

#### 目的)

- 1) 体細胞が多能性幹細胞に再プログラム化されるメカニズム
- 2) 再プログラム化に関わる因子の働き
- 3) 再プログラム化の医学応用技術の開発

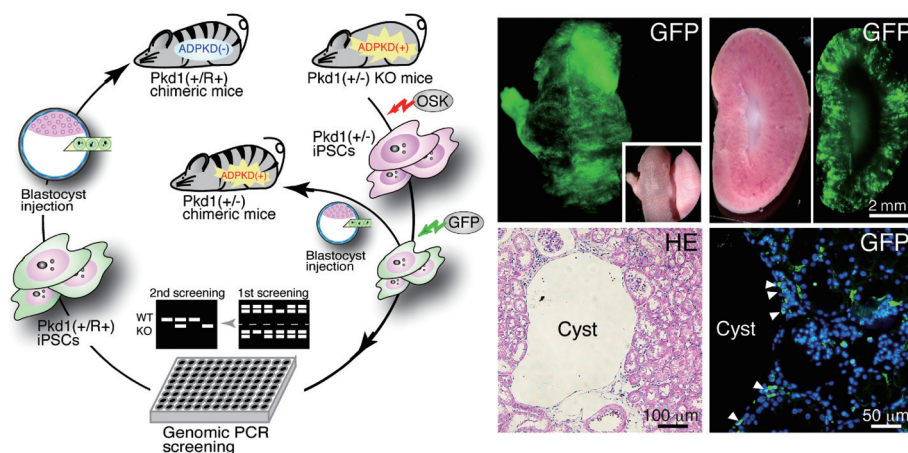


図1 常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)モデルマウス由来の疾患 iPS 細胞の遺伝的異常修復

## 重要性)

基礎生物医学の観点から、再プログラム化メカニズムは、生命を次世代につなぐ仕組みを解き明かすための鍵となる。一方、医学応用の観点から、再プログラム化による個人体細胞からの多能性幹細胞の作製成功は、拒絶反応を伴わない移植分化細胞の医療応用の扉を開き、再生医療の現実性を高める大きな一歩である。医療応用に向けて、解決しなければならない問題に焦点を絞り、一步一步クリアーすることで基礎研究の社会への貢献が実現できる。

## Background)

Our body is built by an incredible variety of cell and tissue types, which develop from a single fertilized egg through embryogenesis. Determination of the cell fate is epigenetically regulated through activation or repression of specific genes. Nuclear reprogramming is a phenomenon that a specialized somatic cell acquires pluripotential competence, which is defined by multi-lineage differentiation, due to reset of epigenetic memory of the somatic cell. We found that embryonic stem (ES) cells, which have the robust capability of self-renewal with pluripotency under culture conditions, retain the nuclear reprogramming activity as shown by cell fusion with a somatic cell (Tada et al. (2001) Curr.Biol.). These findings have indicated the reality of direct reprogramming of somatic cell under a culture condition with factors isolated from ES cells. Tremendously, it has been discovered that defined factors Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc highly expressed in ES cells are sufficient for triggering nuclear reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem (iPS) cells (Takahashi and Yamanaka (2006) Cell). It has been shown that Oct4, Sox2 and Nanog cooperatively function as key transcription regulators in the repression of somatic cell genes and the activation of stem cell genes in pluripotent stem cells.

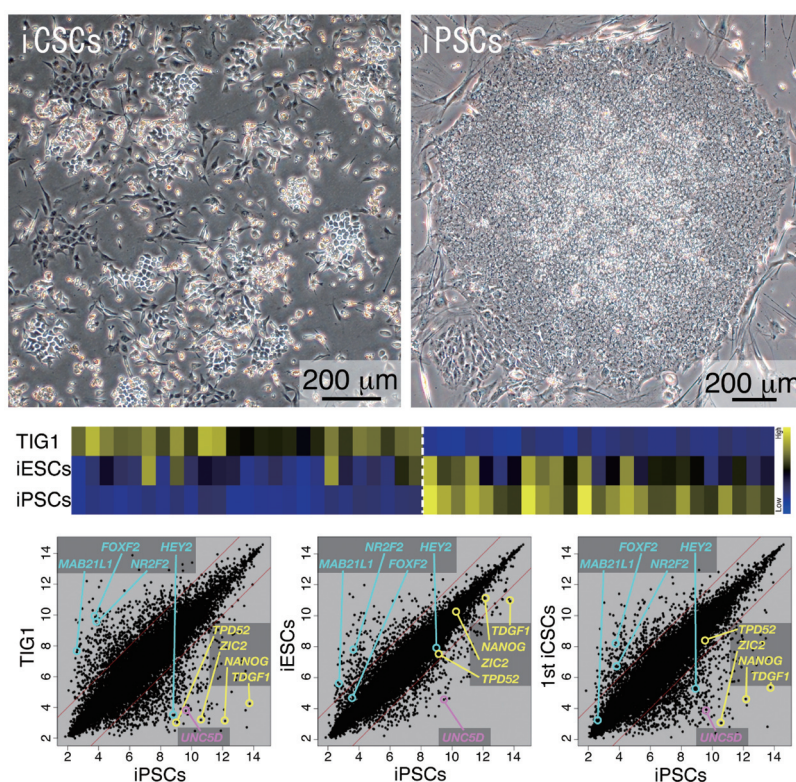


図2 ヒト体細胞から再プログラム化された iPS 細胞と iCS 細胞での遺伝子発現  
TIG1 ; 体細胞, iESC 上皮系幹細胞, iCS ; 癌幹様細胞, iPSC ; iPS 細胞

Reprogrammed somatic genome through cell fusion with ES cells function in cell differentiation similar to the ES genome. Comparative analyses of epigenetic modifications of the somatic genome before and after cell fusion with ES cells demonstrated that the nuclear reprogramming is induced at least through two steps; a) erasure of the somatic cell memory accompanied with global chromatin de-condensation and b) acquirement of the pluripotent stem cell memory. However, the pathway from somatic cell to pluripotent stem cell is largely unknown.

#### Aims)

- 1) Understanding of molecular mechanisms involved in nuclear reprogramming of somatic cells
- 2) Understanding of molecular function of stem cell factors in maintaining pluripotency and self-renewal
- 3) Development of nuclear reprogramming technologies toward clinical applications

#### Importance)

In the field of basic stem cell biology, understanding of the molecular mechanisms of nuclear reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells will shed light on the central dogma, the succession of life. In the field of regenerative medicine, the reality of personal iPS cells from individual somatic cells through nuclear reprogramming rises the great hopes on regenerative medicine in near future. Toward realizing the regenerative medicine, further study will be required to overcome several ethical and practical obstacles.

### 【業績目録】

#### ◆ 誌上発表 ◆

##### 1) 原著論文

Piccolo, F. M., Bagci, H., Brown, K. E., Landeira, D., Soza-Ried, J., Feytout, A., Mooijman, D., Hajkova, P., Leitch, H. G., Tada, T., Kriaucionis, S., Dawlaty, M. M., Jaenisch, R., Merkenschlager, M., Fisher, A.G.: Different Roles for Tet1 and Tet2 Proteins in Reprogramming-Mediated Erasure of Imprints Induced by EGC Fusion. *Molecular Cell*, **49**, 1023-1033 (2013)

##### 2) 著書

Tada, T., Surani, M.A.: Epigenetic reprogramming of somatic nuclei via cell fusion. In "Principle of Cloning, 2<sup>nd</sup> edition" ed. by Jose Cibelli et al. (Academic Press, USA): 11-17 (2013)

Hirano, K., Sun, L.T., Tada, T.: Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. In "Principle of Cloning, 2<sup>nd</sup> edition" ed. by Jose Cibelli et al. (Academic Press, USA): 379-387 (2013)

多田 高: 多能性幹細胞「DOJIN BIOSCIENCE シリーズ『エビジェネティクス』その分子機構から高次生命機能まで」(田嶋正二 編集)203-216(化学同人, 京都 2013)

多田 高: 幹細胞の染色体・細胞核, 「DOJIN BIOSCIENCE シリーズ『染色体と細胞核のダイナミクス』 DNAを操る細胞の仕組み」(平岡 泰・原口徳子 編集)201-212(化学同人, 京都 2013)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Liang-Tso Sun, Shinpei Yamaguchi, Takashi Tada: Function and expression regulation of Nanog in mouse blast :  
「第 36 回日本分子生物学会年会」(2013.12.03-06. 神戸)

2) 講演・シンポジウム

多田 高: iPS 細胞からのメッセージ: 「久留米明善高等学校講演会」(2013.05.28. 福岡)

多田 高: iPS 細胞からのメッセージ: 「酒田東高等学校講演会」(2013.03.07. 山形)

多田 高: iPS 細胞からのメッセージ: 「釜石高等学校講演会」(2013.03.05. 岩手)

## 附属再生実験動物施設

### Laboratory of Animal Experiments for Regeneration

施設長・教授 近藤 玄

Acting Head, Prof. Gen Kondoh

#### 【再生実験動物施設の現状について】

附属再生実験動物施設では、平成24年度イス；142頭、サル；1頭、ウサギ；45羽、ラット；147匹、マウス；6,948匹が実験動物として飼養された(京都大学動物実験委員会「動物実験に関する自己点検・評価報告書」平成25年8月版による)。これらの実験動物の日常的な飼育・管理を専任教授1名・技術職員3名・非常勤職員15名で行っている。

当研究所で動物実験を行うにあたっては、生命倫理・動物福祉に十分の理解と配慮をして実施する事が大前提である。この原則を周知・徹底させるため、動物実験に従事する者は、動物実験に関する法規制・内規、動物実験実施にあたっての原則、実験動物の取り扱い方等についての全学講習および所内講習を受講することが義務付けられている。南部総合研究実験棟・動物飼育室を利用する者は、これに加えて、SPF(Specific Pathogen Free)マウスの取り扱いについて実地講習を受けなければならない。また、動物実験を実施するには、動物実験計画書を当研究所の動物実験委員会に提出し、厳格な審査を受け承認を得ることが必要である。

南部総合研究実験棟(2002年12月設置、再生医科学研究所、ウイルス研究所、医学部の3部局による共同研究実験棟)マウス飼育室は稼動を開始してから12年が経過した。現在、SPFマウス飼育室全16室中、再生研；11室、ウイルス研；4室、医学部；1室、を使用している。本マウス飼育棟ではSPFマウスのみが飼育され、動物実験が行われている。搬入できるマウスは、指定実験動物供給業者から購入可能なSPFマウス及び当施設等において体外受精・受精卵移植によるクリーンアップを受けSPF化されたマウスのみ限定されている。また、飼育室に持ち込む生物試料(細胞・血清等)も、事前に当施設による検疫を受けることが義務付けられた。これらの厳格な管理の下、現在までのところ、感染事故等の深刻な問題は起きていない。ただ、共同実験棟マウス飼育室においては、SPFマウスの微生物汚染を防止するためには、動物飼育員、利用者各人の十分な注意が必要であるが、多数の人間が出入りする以上、いつ何時汚染事故が生じるかもしれない。不幸にして、幾つかの他校動物実験施設で微生物汚染事故が発生したことが報告されている。それらの苦い経験から、SPFマウスの微生物汚染の発生原因、汚染拡大様式、汚染除去法などを十分に学び、万一汚染が生じた時のことも想定し、汚染を最小限度に封じ込める等の対策について、本動物施設でも予め具体的な方策を立てておくことが必要であろう。一方、稼働し始めて明らかとなってきた設計、建築、設備上の種々の問題点、すなわち、室温・風量制御、凍結防止対策の不備等も徐々に把握されつつあり、対応可能になってきた。また、施設運営に関しても、3部局共同の建物であるため、当初、運営・予算の執行における困難さが指摘されてきたが、試行錯誤ながらも克服されつつある。ただ、法人化後の運営費交付金の削減により、安定した施設運営が困難になりつつあり、この様な恒常的施設運営のための別枠の予算措置が講じられることを期待するものである。

東館動物施設は、副施設長による管理のもと、時代の要請に適合した飼育施設に変貌しつつある。すなわち、指紋認証制による利用者登録の導入、サル飼育室の改良、遺伝子改変動物飼育に適合したマウス・ラット室の改造等



である。また、イヌについても、飼育数と出入の厳密なる把握により、スムーズな登録と狂犬病予防注射が可能になった。しかしながら、施設・備品の老朽化が進行しつつあり、問題発生時に、まさに自転車操業的に対応しているのが現状である。また、毎年度予算的にも逼迫しており、このような対応がいつまで続けられるか予測不能である。今後は、大規模な改装を念頭にのいた施設運営が望まれる。

## 【研究概要】

再生実験動物施設は、再生医科学研究所の附属施設として、研究実施に不可欠である動物実験に関する全般的な管理業務(再生研の動物実験計画書の審査に関係する業務、動物実験に関する講習会の開催、再生研における実験動物の維持、管理など)と共に、一研究分野として以下の研究活動を行っている。

### 研究テーマ 1. GPI アンカー型タンパク質の代謝メカニズムと受精

現在の当研究室のメインテーマは、膜結合タンパク質の一種であるグリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型タンパク質(GPI-AP)の代謝メカニズムの解明とその生殖細胞系列での生物学的意義の探究である。このため、まず、個体内での GPI-AP の局在を網羅的に解析するために、GPI アンカー型 GFP レポーター蛋白質(EGFP-GPI)を構築した。これを導入したトランスジェニックマウスでは、予想以上に EGFP-GPI が、外分泌腺や精巣において遊離していることを見出した(Kondoh G. et al. *FEBS lett.* 458, 299-303, 1999)。

以後、この現象に特に着目し、マウス精巣生殖細胞より GPI-AP 遊離因子の精製・構造解析を行った。その結果、この因子のひとつとしてアンギオテンシン変換酵素(ACE)を単離した。すなわち、この酵素には、アンギオテンシン I やブラディキニンなどの昇圧ペプチドの活性を制御するのみならず、多くの GPI-AP を細胞膜より遊離する新たな活性を持つことが明らかとなった。また、今回同定した活性は、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼとしてこれらのペプチドを分解するための活性中心とは別の部位に位置し、また、GPI-AP のペプチド部分ではなく、GPI アンカーそのものを切断することも突き止めた。一方、ACE ノックアウトマウスでは、精子-透明体結合不全による雄性不妊が知られている。そこで、このマウスの精子をジペプチダーゼ不活性型 ACE で処理したところ受精能が回復した。このことから、ACE は in vivo で GPI-AP 遊離活性(GPIase)があり、この活性をもって受精に重要な役割を担っていることが示唆された(Kondoh G. et al. *Nat. Med.*, 11, 160-166, 2005)。また、GPI アンカーの生合成に関わる PGAP1 遺伝子ノックアウトマウスでも、ACE ノックアウトマウスと酷似の雄性不妊を示し、同じく精子膜上の GPI-AP が貯留傾向にある。これらのことから精子膜からの GPI-AP 遊離が精子の受精能獲得の重要なステップである可能性が示唆された。

そこで、この過程を追跡する GPI アンカー型 GFP(EGFP-GPI) Tg マウスを用い、精子における GPI-AP 遊離と受精能獲得との相関を詳細に解析した。まず、精巣上体精子を採取し、精子成熟を誘導する methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD)を含む培養液で培養したところ、時間経過とともに蛍光の減衰が見られた。また、Hyal5, Prss21 などの内在性 GPI-AP も顕著に遊離した。このとき同時にラフトマーカである GM1 の局在を蛍光標識したコレラトキシン(CTB)で染色したところ、精子頭部膜ラフトの特異的な局在変化が見られた。M- $\beta$ -CD 単独処理ではこれらの変化は見られたが、もうひとつの精子成熟誘導試薬である BSA 単独では有意な変化が見られなかった。そこで BSA に加えカルシウムイオノフォア処理することで強制的に先体反応を促進したところ、上記精子膜変化が顕著に見られた。これらのことから精子膜変化は先体反応に伴って起こることが示唆された。また、M- $\beta$ -CD 処理群につき Izumol の局在変化を指標に先体反応が起こっているかを調べたところ、有意な先体反応が観察された。すな

わち、M- $\beta$ -CD は従来から言われている capacitation 誘導に加えて先体反応も促進することがわかった。我々は、上記精子膜変化に先体反応を加えて一連の現象を精子膜反応 (sperm membrane reaction, SMR) と呼称し、射出精子での解析を行った。その結果、SMR は子宮内精子ではほとんど見られなかったが、卵管内遊走精子の約 40%、卵丘細胞層侵入精子の約 70%、また透明帯接着精子の全てで観察され、SMR は卵管内で階層的に起こることが示唆された (Watanabe H. and G. Kondoh *J. Cell Sci.*, 124, 2573-2581, 2011)。次に、これらの変化を誘導する生体内因子を同定するため、3 条件 (1. 発情未交配, 2. 精管結紮雄マウスと交配, 3. 正常雄マウスと交配) の雌から子宮卵管移行部組織を採取し、マイクロアレイ比較解析を行った。条件 2 と条件 3 の違いは、条件 3 では精子および精巢上体分泌物による刺激が加わることにある。そこでこれらの間の遺伝子発現プロファイルを比較すると、210 個の遺伝子が 3>2 の発現上昇を示した。さらに構造的に分泌型もしくは膜結合型タンパク質をコードするものを選び出した。現在、その中からひとつの仮称 Sperm Maturation Factor of Female (SMF-F) 候補遺伝子に着目して解析を進めている。

## 研究テーマ 2. 遺伝子改変マウス作出技術の簡易化

遺伝子改変マウスの作出には、何段階ものプロセスが存在し、多くの時間・労力・経費を必要とする。なかでも特に問題になるのが、ターゲティングベクターの作製、ES 細胞の培養そしてキメラマウス作出の諸段階であろう。我々は、これらのステップにおける“時間と労力のかからない技術の採用や改良”を心掛けてきた。最近、Tol2 トランスポゾンや CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いた簡易な遺伝子改変マウス作出技術が開発された。当施設でもこれらを積極的に取り入れて、利用者の利便性や 3R に基づくマウス作出をこれからも図ってゆく所存である。これらの技術集約のもとに、過去 9 年間で 10 報の論文発表に、遺伝子改変マウス作出担当として参加した。

Mammalian sperm undergo multiple maturation steps after leaving the testis in order to become competent for fertilization, although the molecular mechanisms underlying this process remain unclear. In terms of identifying factors crucial for these processes *in vivo*, we found a putative sperm maturation factor of female (SMF-F). Most sperm that migrated to the oviduct of wild-type female underwent lipid raft reorganization and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein shedding via SMF-F dependent manner. These observations imply that mammals possess another mode for sperm maturation, different from the conventional albumin-mediated pathway.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 原著論文

Fujihara, Y., Tokuhira, K., Muro, Y., Kondoh, G., Araki, Y., Ikawa, M., and Okabe, M. Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 8111-8116 (2013).

Umehara Y., J. Yoshida, M. Wada, Y. Tsuchiya, Y. Minami, H. Watanabe, G. Kondoh, J. Takeda, H. Inokawa, K. Horie, and K. Yagita. An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2 $\alpha$  as an endogenous clock regulator. *PLoS ONE*, 8(6), e67241 (2013).

Kim, C-J, Y. Tambe, K-I. Mukaisho, H. Sugihara, T. Isono, H. Sonoda, T. Shimizu, G. Kondoh, and H. Inoue. Female-

specific rectal carcinogenesis in cyclin D1b transgenic mice. *Carcinogenesis*, 35-1, 227-236 (2014).

---

◆ 学会等の発表 ◆

学会・研究会発表

渡邊仁美, 竹尾 透, 東城博雅, 酒匂一仁, 中潟直己, 近藤 玄 リポカリン2による雌生殖路内における精子成熟機構の解明 第60回日本実験動物学会 2013, 筑波市.

(文責: 近藤 玄)

# 附属ナノ再生医工学研究センター Research Center for Nano Medical Engineering

## ナノバイオプロセス研究領域 Department of Nano Bioprocess

分野主任 教授 楠見 明弘

*Prof. Akihiro Kusumi*

### 【研究概要】

#### 1. 生きている細胞中での1分子観察と操作法の開発

世界的には、in vitro での1分子観察と操作ができる研究室は増えてきている。しかし、私達の研究室の特徴は、1分子観察と操作を生細胞中でおこなうことで、それによって、1分子細胞生物学が可能になった。具体的には生きている細胞中の1分子を、マイクロ秒レベルの時間分解能、ナノメートルレベルの空間精度で追跡し、さらに、それらの分子の活性化(反応)までも1分子毎に見る方法を開発してきた(これらは世界でも我々のみ)。これは、ナノサイエンス/ナノテクノロジーとの融合領域として、1分子ナノバイオロジー、1分子細胞生物学という新しい学問分野の創造につながりつつある。

なお、以下の発見は、1分子法を使って初めて可能になったものであり、単なる生細胞中でのイメージングや多数分子の計測では不可能であったものばかりである。

#### 2. 細胞膜の基本的な構造と、働き方について

細胞膜は2次元の液体(連続体)と考えられてきた。しかし、私達は、(1)細胞膜はコンパートメント化されていること、(2)これは細胞膜に取り込まれた全ての分子に対して働くこと、(3)その機構は、基本的にはアクチン膜骨格によるもので、膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質が拡散障壁として働くこと、などを示した。これは、シンガー-ニコルソンモデルに重要な変更を迫るものであり、膜の構造と働き方について、基本的なパラダイムシフトを起こした研究である。

さらに最近、電子線トモグラフィー法を用いて、細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化することに成功した。細胞膜試料として、細胞膜の内側表面を急速凍結ディープエッチ白金レプリカに写し取ったものを用いた。これによって、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めたところ、それが、膜分子の拡散によって得られたコンパートメントの大きさとピッタリと一致した(図1参照)。

受容体はシグナルを受けた後、会合して運動を停止するものが多いが(シグナルが来た位置を数十秒程度記憶する)、これは、会合体が膜骨格によるコンパートメントに閉じ込められるか、膜骨格に結合することによることがわかった。さらに、神経細胞の細胞膜には脂質をも通さない拡散障壁が生じるが、これも、アクチン膜骨格とここに結合する膜貫通型タンパク質が密に集合することによって出来ることを示した。

#### 3. シグナル伝達の基本的な仕組みについて

シグナル伝達は、多くの場合、シグナル分子のランダムな拡散運動と衝突によって担われると考えられてきた。

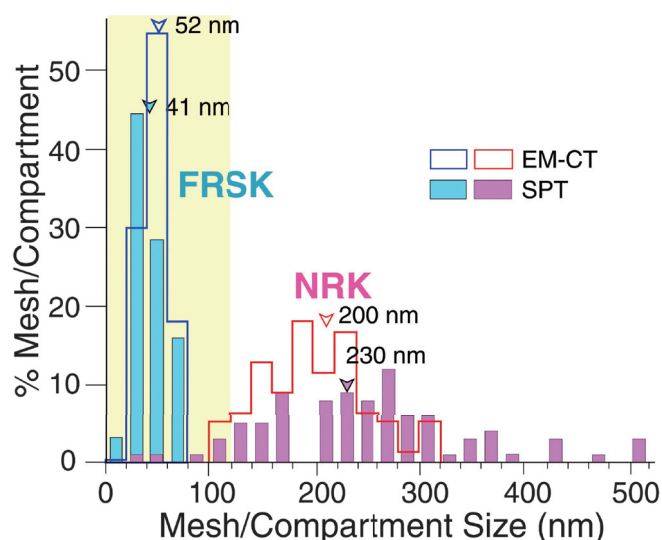


図 1

細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オープンバーで示す。赤がNRK細胞、青が、FRSK細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる2種の細胞で、それぞれ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のピケットモデルを強く支持する。

近年の、多くの足場タンパク質の発見は、これとは全く逆に、上流と下流の分子は、足場タンパク質が関与する場合にはずっと結合しているものであり、シグナルが来たら、固体の電気回路のように、シグナルを伝えるものであると考えられるようになった。しかし、私達は、ある分子が活性化されると、それに結合する足場タンパク質、下流分子などが急速に集まって信号複合体を形成すること、それらの多くは安定ではなく1秒以下の寿命で分解(不活化)する、ことを見いだした(Ras-Rafの系、ラフトの関与する系)。すなわち、1回毎のシグナル伝達は量子化されており、多数分子の平均として観察される生化学やイメージングによるシグナル変化は、これらの量子的なパルス状のシグナルの和であり、それを担うのがこれらの短寿命シグナル複合体であることが示された。これは、シグナル系のシステムとしての働き方を理解するためには、極めて重要な知見で、きわめて動的なシグナル分子の組織化によるシステム動作の一端が見えてきたと言える。

### [Summary of Research]

#### Paradigm shift of the concept of the plasma membrane structure

The plasma membrane has been considered to be a two dimensional liquid, with their constituent molecules, membrane proteins and lipids, diffusing freely in the plasma membrane, the Singer-Nicolson model widely accepted for these 30 years. However, we found that the plasma membrane is partitioned into many small compartments, and both membrane lipids and proteins undergo short-term confined diffusion within a compartment, and long-term hop diffusion between the compartments. These membrane compartments are delimited by the membrane skeleton and the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton (Fujiwara et al., 2002; Murase et al., 2004; Kusumi et al., 2005; Morone et al., 2006). This entails a paradigm shift for the concept of the plasma membrane, from the continuous 2-dimensional fluid to the compartmentalized, structured system. This could be found because we have developed high time resolution (25 microseconds) single-molecule tracking techniques (Kusumi et al., 2005). If more than one molecule is observed at the same time, the single hop event would be masked by averaging.



ing over all the molecules under observations. Without high-time resolutions, the residency time within a compartment for 1 ms to 1 s could not be detected.

### Single-molecule force microscope

An ultra-sensitive, single-molecule optical force scanning probe microscope was developed that uses a single membrane molecule as a probe. This microscope measures the interaction force between the membrane-molecule probe with the membrane skeleton mesh in live cells, and, by mapping the force, images of the membrane skeleton that interact with the membrane molecule were obtained (Ritchie et al., in preparation). A theoretical framework was developed to understand/predict the behavior of single membrane molecules being dragged by the optical trap (Ritchie et al. in preparation).

### Detection of transient interactions of two species of molecules in living cells

Two species of molecules were labelled in different colors, and a method to detect their colocalization at the level of single molecules was developed for the first time (Koyama et al., 2005).

### Single-molecules FRET imaging of H-Ras activation in living cells

The activation of H-Ras, a GTP-binding protein involved in the signaling pathways for cell proliferation and reorganization of the cytoskeleton, was visualized at the level of individual molecules using a technique called single-molecule fluorescence resonance energy transfer (single-molecule FRET ; Murakoshi et al., 2004 ; Kusumi and Murakoshi, 2005). Activation of H-Ras takes place only temporarily (<2 s), and is accompanied by transient immobilization, which is likely due to the transient formation of an activated-Ras signaling complex with scaffolding proteins.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文・英文総説

- Shibata, A. C. E., Chen, L. H., Nagai, R., Ishidate, F., Chadda, R., Miwa, Y., Naruse, K., Shirai, Y. M., Fujiwara, T. K., and Kusumi, A. : Rac1 recruitment to the archipelago structure of the focal adhesion through the fluid membrane as revealed by single-molecule analysis. *Cytoskeleton* **70** : 161-177 (2013)
- Nagata, K. O., Nakada, C., Kasai, R. S., Kusumi, A., and Ueda, K. : ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110** : 5034-5039 (2013)
- Nishimura, H., Ritchie, K., Kasai, R. S., Morone, N., Sugimura, H., Tanaka, K., Sase, I., Yoshimura, A., Nakano, Y., Fujiwara, T. K., and Kusumi, A. : Biocompatible fluorescent silicon nanocrystals for single-molecule tracking and fluorescence imaging. *J. Cell Biol.* **202** : 967-983 (2013)
- Yoshikawa, N., Hirori, H., Watanabe, H., Aoki, T., Ihara, T., Kusuda, R., Wolpert, C., Fujiwara, T. K., Kusumi, A., Kanemitsu, Y., and Tanaka, K. : Biexciton state causes photoluminescence fluctuations in CdSe/ZnS core/shell quantum dots at high photoexcitation densities. *Phys. Rev. B* **88**, 155440, 1-5 (2013)
- Suzuki, K. G. N., Kasai, R. S., Fujiwara, T. K., and Kusumi, A. : Single-molecule imaging of receptor-receptor

interactions. *Methods in Cell Biol.* **117**, 373-390(2013)

Kasai, R. S., and Kusumi, A.: Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **27C**, 78-86(2013)

## 2) 和文総説

柴田明裕, 楠見明弘: 接着斑の群島構造モデルと形成機構: 1分子イメージングによる解明. *生体の科学*, **64**(3): 232-238(2013)

藤原敬宏, 笠井倫志, 楠見明弘: 超高速・超解像1蛍光分子顕微鏡. *現代化学*, **508**: 50-51(2013)

笠井倫志: 1分子イメージングにより明らかになったGPCRのモノマー・ダイマーの動的な交換. *Clinical Neuroscience 月刊 臨床神経科学*, **31**: 1118-1119(2013)

鈴木健一, 楠見明弘: 新ラフト仮説: 細胞膜ラフトによるシグナル伝達機構. *生物物理*, **53**(6): 295-300(2013)

楠見明弘, 鈴木健一, 藤原敬宏, 笠井倫志: 1分子イメージングによる細胞膜シグナル変換機構の解明. *生体の科学*, **64**(6): 539-544(2013)

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 国際学会・外国の学会での招待講演

#### 1A) 国外開催

Kasai, R. and Kusumi, A.: Cell's first steps for raft formation and function as revealed by single-molecule imaging and tracking. Cold Spring Harbor Symposium Asia "New Advances in Optical Imaging of Live Cells and Organisms" (2013.8.20-23. Suzhou, China)

Kusumi, A.: Hypothesis of unit rafts as organizers of the meso-scale domain structure and function in the plasma membrane. *Diffusion Fundamentals V*(2013.8.26-28. Leipzig, Germany)

Kusumi, A.: Unit raft hypothesis: a proposition based on advanced single-molecule imaging results. *ENGINEERING LIFE 2013 Symposium*(2013.9.17-18. Dresden, Germany)

Kusumi, A.: Short-lived homodimer rafts of GPI-anchored proteins and glycolipids as basic units for organization and operation of raft microcompartments. *International Symposium on Microcompartments*(2013.9.19-21. Osnabrück, Germany)

#### 1B) 国内開催

Kasai, R. S.: Dynamic monomer-dimer equilibrium as a general property of the class A GPCR: single-molecule imaging study. *The 14th International Membrane Research Forum*(2013.3.15-17 Kyoto)(2013.3.18-19. Kyoto)

Kusumi, A.: First steps to raft formation as revealed by single-molecule tracking: transient GPI-anchored protein homodimer rafts are basic units for raft organization and function. *RSC Publishing-iCeMS Joint International Symposium "Cell-Material Integration and Biomaterials Science"*(2013.3.18-19. Kyoto)

### 2) 国外の大学・研究機関での招待講演

Kusumi, A.: Hierarchical and dynamic organization of the plasma membrane for signal transduction revealed by

single-molecule tracking. Department of Chemistry and Department of Biology, King's College London  
(2013.12.10 London, U.K.)

### 3) 国内での招待講演

楠見明弘：細胞膜シグナル伝達を担うメゾスケールドメイン構造：1分子イメージング解析による研究，大阪大学  
蛋白質研究所セミナー「シグナル伝達と解析技術のあらたな潮流」(2013.3.5. 大阪)

楠見明弘：ラフト形成と機能のための細胞の第一歩，第86回日本薬理学会年会シンポジウム13「脳神経疾患の分子  
病態解析のための最新アイデアと新技術」(2013.3.21-23. 福岡)

楠見明弘：糖脂質のホモダイマー単位ラフトがラフトを作って働く：1分子イメージングによる解明，第57回日本  
顕微鏡学会シンポジウム シンポジウム5「光顕微鏡による解析」(2013.11.15-16. 名古屋)

楠見明弘：細胞膜に見るメゾスケール分子組織化と機能の原理：超1分子イメージングによる解明，京都大学再生医  
科学研究所「平成25年度学術講演会」(2013.12.25. 京都)

## ナノバイオメカニズム研究領域 Department of Nano Biomechanism

助教 都賀谷紀宏

Assist. Prof. Toshihiro Togaya

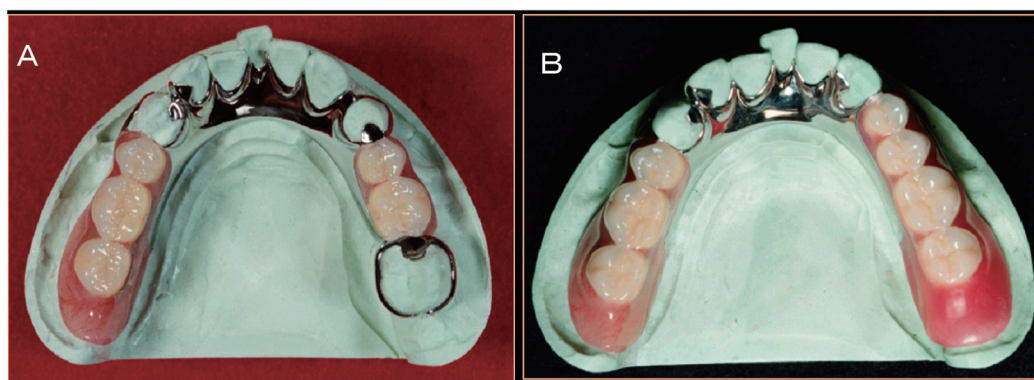
### 【研究概要】

歯の欠損は、歯科口腔機能の障害や低下のみならず、審美性の低下ももたらし、生活の質の低下にも結びつく。近年、高齢化に伴い、従来から用いられている義歯の需要も伸びてきている。また、欠損補綴分野でのインプラントの普及も著しいものがある。このような状況のなか、歯科補綴物の品質に対する要求はより高まってきており、特にインプラントのような人工歯根を用いた場合、その上部構造(義歯)には、高い精度が要求される。

本研究分野では、歯科補綴物に用いられる材料の成形加工法について、レーザー加工法を中心として検討し、生物学的適合性、力学的適合性および形態的適合性に優れた高精度歯科補綴物の製作システムについて研究している。また、これらの歯科補綴物製作を担当する歯科技工士の高齢化や若手技工士の離職率の高さが社会問題になりつつあり、熟練技工士の技術の伝承をいかに行うか、次世代の技工士をいかに養成するか、という社会学的問題についても検討している。

Restoration and maintenance of oral function (ingestion, mastication, swallowing and phonation) are essential for ADL (activity of daily living) and QOL (quality of life) especially in the elderly. The goal of our study is to establish the fabrication systems of precision dental prostheses, which have excellent biological-, mechanical- and morphological-compatibility.

On the other side, there is a big social problem in the manufacturing industry of the dental prostheses in Japan. The society tends to be composed by elderly dental technicians, and many young people in this field quit work because they do not feel financially stable. We are also investigating such a sociological problem.



レーザー加工によってリフォームされた義歯。鉤歯が抜歯されたため、この部分だけ義歯を作製し直し、旧義歯と接合した。これまでは一から作り直さなければならなかったものがリフォームで済み、患者の満足度も高い。

A: リフォーム前 B: リフォーム後

## 【業績目録】

### ◆学会等の発表◆

#### 1) 講演・シンポジウム

都賀谷紀宏：ジーシー研究所外部講師定期講演会「グローバル化する歯科技工界と我が国の歯科技工界の行方」  
(2013.2.27. 東京都)

都賀谷紀宏：清流会第392回例会「グローバル化する歯科技工界と日本の歯科医療」(2013.5.9. 大阪市)

都賀谷紀宏：第6回歯科レーザープロセッシングフォーラム「医歯一元論・二元論と歯科技工 ～歯科技工士の“立ち位置”を考える～」(特別講演)(2013.7.20. 松江市)

都賀谷紀宏：平成25年度関西北陸地区歯科技工士学校連絡協議会「医歯一元論・二元論と歯科技工～歯科技工士の“立ち位置”を考える～」(特別講演)(2013.8.2. 京都市)

都賀谷紀宏：第28回DLPフォーラム「『歯科技工学概論』のすすめ – 歯科医学の歴史からこれからの歯科技工を考える」(2013.12.7. 横浜市)



## バイオメカニクス研究領域 Department of Biomechanics

分野主任 教授 安達 泰治

Prof. Taiji Adachi

### 【研究概要】

本研究領域は、生体組織の発生・再生における幹細胞分化、形態形成、機能的適応過程において、細胞が分子レベルで力学的刺激を感知し、その情報を細胞の活動に結びつけるメカニズムの解明を目指している。マクロに現れる力学的な環境の変化に対する生体の適応的な応答現象を理解するため、細胞・分子レベルにおけるミクロな要素過程の解明とそれらが形成するシステムとしてのふるまいを理解することを目指している。そこで、「力学環境への適応性」と「構造・機能の階層性」に着目し、各種力学を基礎として、実験と数理モデリング・計算機シミュレーションを組み合わせたバイオメカニクス・メカノバイオロジー研究を進めている。

#### (1) 多細胞組織の形態形成のバイオメカニクス

形態形成における上皮シート組織では、内腔(アピカル)側にも基底膜(ベースル)側にも連続的に滑らかな曲率の形状が見られる。例えば、発生初期における神経管や眼胞などの上皮組織では、急激な組織成長にもかかわらず、連続的に滑らかな曲率が維持されている。細胞分裂が生じると、局所的な力の釣り合いが乱れるため、時間・空間的に協調していない細胞分裂が頻繁に生じるとき、どのように組織スケールに連続的に滑らかな曲率が維持されるのかは自明ではない。滑らかな表面形状を有するような胚発生期の上皮組織の多くは、アピカル側に凹である。これは、アピカル面内に強い収縮力が存在するためと考えられる。本研究では、我々が開発してきた多細胞動態の数理モデル(RNR モデル)を用いた上皮組織成長のシミュレーションを行い、滑らかな表面形状に対するアピカル収縮力の効果を検討した。その結果、ア

ピカル面の収縮力が上皮組織の滑らかな曲率の維持に必須の役割を担っており、規則性なく発生する細胞同士の押し合う力による不規則な凸凹を減少させることが示された。さらに、アピカル収縮力の存在は、単にアピカル側の不規則な凸凹を抑えるだけでなく、ベースル側も抑えることが示された。これらの結果から、アピカル面の細胞の収縮力が細胞1個レベルの形を制御するのみならず、力学的協調の創発の結果として、組織レベルの形状をも制御していることが示唆された。

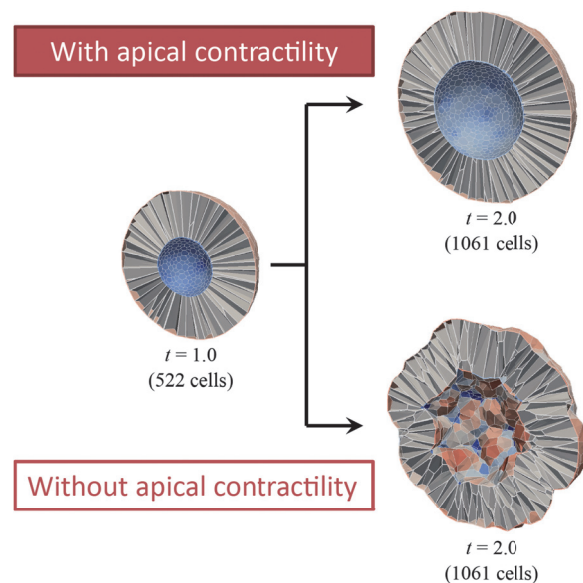


図1 多細胞組織の形態形成シミュレーション

Fig. 1 Computer simulation of multi-cellular tissue morphogenesis

## (2) 原子間力顕微鏡を用いたアクチンフィラメント-アクチン結合蛋白質相互作用測定

アクチンフィラメントは、細胞骨格において、網目構造や束構造などの高次のネットワーク構造をかたち作り、細胞の運動や形態形成を支えている。アクチンネットワーク構造は、アクチンフィラメントとアクチン結合タンパク質との相互作用により構築され、力学的因子や生化学的因子の影響を受け、その構造をダイナミックに変化させている。したがって、アクチン細胞骨格ダイナミクスの理解には、力学的因子、および、生化学的因子の影響により、アクチンフィラメントとアクチン結合タンパク質の相互作用がどのように変化するかを定量的に測定することが重要である。そこで本研究では、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy: AFM)を用いたアクチンフィラメントとアクチン結合タンパク質の相互作用測定法の開発した。AFMのフォースカーブ測定により生体分子間相互作用を測定するフォーススペクトロスコピー法を用いて、アクチンフィラメントとアクチンフィラメント架橋蛋白質である $\alpha$ -アクチニンの相互作用測定を行った。得られたフォースカーブを用いてアクチンフィラメント・ $\alpha$ -アクチニンの結合破断に必要な力(rupture force)をヒストグラム分析し平均値を求めた結果、非特異的な相互作用を示すアクチンフィラメント・BSAの結合解除力より有意に大きいことが明らかになった。さらに、アクチンフィラメント・ $\alpha$ -アクチニンの解離定数を求めることが可能であった。本手法は、アクチンフィラメントとアクチン結合蛋白質との相互作用の測定に非常に有用であり、基板上の力学環境を調節可能であることから、アクチンフィラメントの力学特性変化によるアクチン結合蛋白質との相互作用変化測定に応用できると期待される。

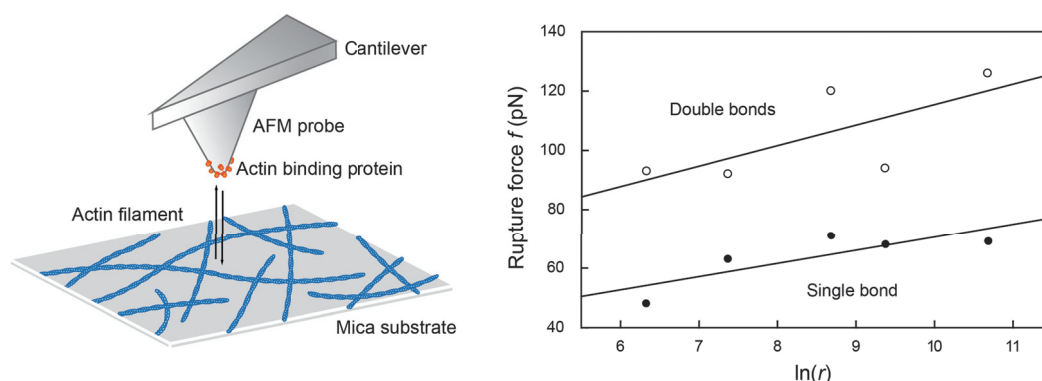


図2 AFMを用いたアクチンフィラメントと $\alpha$ アクチニンの相互作用計測

Fig. 2 Actin filament/ $\alpha$ -actinin interaction measurement using AFM

In functional tissue adaptation, regeneration and stem cell differentiation in morphogenesis, the mechanism by which local mechanical signals are sensed by cells and tissues remodel/regenerate their structure to meet their functional demands remains unclear because of the complex hierarchical system in spatiotemporal scales. To better understand the mechanoregulation of tissue adaptation by remodeling, morphogenesis, and regeneration, bridging spatial and temporal scales from microscopic molecular and cellular activities to macroscopic tissue behaviors is very important. Based on multiscale system biomechanics, our department is involved in integrated biomechanics/mechanobiology researches of modeling and simulation combined with experiments, focusing on mechano-biochemical couplings in the dynamics of structure-function relationships in tissues and cells.

## (1) Biomechanics of multi-cellular tissue morphogenesis

In general, a rapidly growing epithelial sheet during tissue morphogenesis shows a smooth and continuous curvature on both inner cavity (apical) and basement membrane (basal) sides. For instance, epithelia of the neural

tube and optic vesicle in the early embryo maintain continuous curvatures in their local domains, even during their rapid growth. However, given that cell divisions, which substantially perturb the local force balance, frequently and successively occur in an uncoordinated manner, it is not self-evident to explain how the tissue keeps a continuous curvature at large. In the majority of developing embryonic epithelia with smooth surfaces, their curvatures are apically concave, because of the presence of strong tangential contractile force on the apical side.

In this numerical study, we demonstrate that tangential contractile forces on the apical surface plays a critical role in the maintenance of smooth curvatures in the epithelium and reduces irregular undulations caused by uncoordinated generation of local pushing force. Using a reversible network reconnection (RNR) model, which we previously developed to make numerical analyses highly reproducible even under rapid tissue-growth conditions, we performed simulations for morphodynamics to examine the effect of apical contractile forces on the continuity of curvatures. Interestingly, the presence of apical contractile forces suppressed irregular undulations not only on the apical side, but also on the basal surface. These results indicate that cellular contractile forces on the apical surface control not only the shape at a single cell level, but also at a tissue level as a result of emergent mechanical coordination.

## (2) Actin filament-actin binding protein interaction measurement using atomic force microscopy

Actin filaments play essential roles in many kinds of biological functions. Especially, mechanotransduction is mediated by the actin filament dynamics based on the interaction between the actin filaments and hundreds of actin binding proteins. The actin filament/binding protein interaction is influenced by the actin filament mechanical conditions such as contraction, tension, and bending. We probed the interaction between actin filament and a binding protein,  $\alpha$ -actinin, using an atomic force microscopy (AFM) and single molecular force spectroscopy (SMFS). The distribution of rupturing events including specific and non-specific interactions of actin filament/ $\alpha$ -actinin and BSA/ $\alpha$ -actinin were analyzed.

The rupture force of the actin filament/ $\alpha$ -actinin binding was significantly larger than that of the BSA/ $\alpha$ -actinin non-specific interaction, and the peaks represent typical multiple parallel bonds. In addition, based on the rupture forces in different loading rate SMFS experiments, the dissociation constant of actin filament/ $\alpha$ -actinin binding was estimated. The value is in good agreement with a previously reported value obtained by optical tweezer measurement. The present method will be useful for actin filaments/the binding protein interaction measurement and will be applied for the actin dynamics measurement.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Sung-Woong Han, Chikashi Nakamura, Jun Miyake, Sang-Mok Chang, Taiji Adachi: Single-Cell Manipulation and DNA Delivery Technology Using Atomic Force Microscopy and Nanoneedle. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, in press

Naoki Kida, Taiji Adachi: Finite Element Formulation and Analysis for an Arterial Wall with Residual and Active

- Stresses. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, in press
- Sung-Woong Han, Takato Tamaki, Taiji Adachi : A Novel Osteoblast/Osteocyte Selection Method in Primary Isolated Chick Bone Cells by Atomic Force Microscopy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, in press
- Naoki Kida, Taiji Adachi : Numerical Analysis of Arterial Contraction Regulated by Deformation-dependent Intracellular Calcium Ion Concentration. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, in press
- Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi : Modeling Trabecular Bone Adaptation to Local Bending Load Regulated by Mechanosensing Osteocytes. *Acta Mechanica*, in press
- Sung-Woong Han, Kyohei Morita, Taiji Adachi : A Novel Graphene Oxide-based Protein Interaction Measurement Using Atomic Force Microscopy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, in press
- Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi : Interstitial Fluid Flow in Canaliculi as a Mechanical Stimulus for Cancellous Bone Remodeling : In silico Validation. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, in press
- Sung-Woong Han, Kyohei Morita, Patriche Simona, Takanori Kihara, Jun Miyake, Mihaela Banu, Taiji Adachi : Probing Actin Filament and Binding Protein Interaction Using an Atomic Force Microscopy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, in press
- Mayumi Okamoto, Takashi Namba, Tomoyasu Shinoda, Takefumi Kondo, Tadashi Watanabe, Yasuhiro Inoue, Kosei Takeuchi, Yukiko Enomoto, Kumiko Ota, Kanako Oda, Yoshino Wada, Ken Sagou, Kanako Saito, Akira Sakakibara, Ayano Kawaguchi, Kazunori Nakajima, Taiji Adachi, Toshihiko Fujimori, Masahiro Ueda, Shigeo Hayashi, Kozo Kaibuchi, Takaki Miyata : TAG-1-assisted Progenitor Elongation Streamlines Nuclear Migration to Optimize Subapical Crowding. *Nature Neuroscience*, 16-11 : 1556-1566(2013-11)
- Ryuji Hiramatsu, Toshiki Matsuoka, Chiharu Kimura-Yoshida, Sung-Woong Han, Kyoko Mochida, Taiji Adachi, Shunichi Takayama, Isao Matsuo : External Mechanical Cues Trigger the Establishment of the Anterior-posterior Axis in Early Mouse Embryos. *Developmental Cell*, 27-2 : 131-144(2013-10)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, Taiji Adachi : Modeling Cell Proliferation for Simulating Three-dimensional Tissue Morphogenesis Based on a Reversible Network Reconnection Framework. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 12-5 : 987-996(2013-10)
- Hiromi Miyoshi, Ken-ichi Tsubota, Takamasa Hoyano, Taiji Adachi, Hao Liu : Three-dimensional Modulation of Cortical Plasticity during Pseudopodial Protrusion of Mouse Leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438-4 : 594-599(2013-9)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, Taiji Adachi : Reversible Network Reconnection Model for Simulating Large Deformation in Dynamic Tissue Morphogenesis. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 12-4 : 627-644(2013-8)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, Taiji Adachi : Apical Contractility in Growing Epithelium Supports Robust Maintenance of Smooth Curvatures against Cell-division-induced Mechanical Disturbance. *Journal of Biomechanics*, 46-10 : 1705-1713(2013-6)
- Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi : Role of the Actin-myosin Catch Bond on Actomyosin Aggregate Formation. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 6-1 : 3-12(2013-3)
- Sung-Woong Han, Patriche Simona, Mihaela Banu, Taiji Adachi : Real-time Monitoring of Changes in Microtubule Mechanical Properties in Response to Microtubule-destabilizing Drug Treatment. *Journal of Nanoscience*

and Nanotechnology, 13-3: 2087-2090 (2013-3)

## 2) 著 書

安達泰治, 伊藤 宣(分担執筆): 応力解析を用いた設計－人工足関節を例に, In: 未来型人工関節を目指して－その歴史から将来展望まで－(編: 吉川秀樹, 中野貴由, 松岡厚子, 中島義雄), pp. 87-90, 日本医学館(2013-7)

佐藤正明, 出口真次, 安達泰治, 村上輝夫, 廣川俊二(分担執筆): アクチン細胞骨格のバイオメカニクス, In: バイオメカニクスの最前線, pp. 41-83, 共立出版(2013-2)

## 3) 総 説

安達泰治: 骨の構造・機能適応ダイナミクスの階層性: 数理バイオメカニクス, In: 特集「骨代謝「見えざる手」が制御する骨破壊と骨形成」, 実験医学, Vol. 31, No. 6, pp. 870-876 (2013-4)

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

森田恭平, 韓 成雄, 安達泰治: AFM を用いたアクチンフィラメントとアクチン結合タンパク質の相互作用測定法の開発. 日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)

近藤由章, 井上康博, 安達泰治: 分子動力学法を用いたアクチンフィラメントの張力感受に関わるアミノ酸残基群の力学的挙動の検討. 日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)

奥田 覚, 井上康博, 永樂元次, 笹井芳樹, 安達泰治: リバーシブル・ネットワーク・リコネクションモデルに基づく組織形態形成シミュレーションのための細胞増殖の数理モデル化. 日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)

三好洋美, 朱 正明, Lee Sang Min, Ko Jong Soo, 安達泰治, 山形 豊: マイクロ/ナノ構造中の細胞におけるアクチン細胞骨格. 日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)

鈴木健介, 永樂元次, 須長純子, 笹井芳樹, 安達泰治: 眼杯の形態形成における細胞分裂周期観察の実験系構築. 日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)

亀尾佳貴, 上岡 寛, 安達泰治他: 骨細管内の細胞外マトリックスが流れによる骨細胞突起変形に及ぼす影響. 日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング講演会(2013.1.9-11. つくば)

藤井徹矢, 井上康博, 安達泰治: 分子動力学法による平衡状態におけるコフィリン修飾アクチンフィラメントのエネルギー解析. 次世代生命体統合シミュレーションソフトウェアの研究開発(ISLiM)最終成果報告会(2013.1.10-11. 神戸)

Shukei Sugita, Taiji Adachi, Yosuke Ueki, Masaaki Sato: Quantification of Tension in Stress Fibers in Semi-Intact Cells. The 23rd CDB Meeting "Building multicellular systems from cellular cross-talk"(2013.1.22-23. Kobe)

Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: The Actin-Myosin Catch Bond Assists Myosin Aggregation in a Random Actomyosin Network. The 23rd CDB Meeting "Building multicellular systems from cellular cross-talk"(2013.1.22-23. Kobe)

奥田 覚, 井上康博, 永樂元次, 笹井芳樹, 安達泰治: 組織の形態形成過程における多細胞ダイナミクスの力学シ



- ミュレーション. 文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング」第3回 Vivid Workshop(2013.2.21-23. 石川)
- 牧功一郎, 韓 成雄, 安達泰治: AFM ナノフィッシングによる接着結合構成タンパク質の力学的挙動解析. 文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング」第3回 Vivid Workshop(2013.2.21-23. 石川)
- 木田直樹, 安達泰治: 構造-化学連成による平滑筋細胞内アクチンミオシン収縮機構の数理モデル化. 第62回理論応用力学連合講演会(2013.3.6-8. 大岡山)
- Hiromi Miyoshi, Takehiko Inaba, Takuma Kishimoto, Jong Soo Ko, Taiji Adachi, Toshihide Kobayashi, Yutaka Yamagata: Quantitative Image-Based Analysis of Cooperative Dynamics of Actin Cytoskeleton and Cell Membrane in Cell Shape Determination. The 10<sup>th</sup> NIBB-EMBL Symposium 2013: Quantitative Bioimaging (2013.3.17-19. Okazaki)
- Sung-Woong Han, Kyohei Morita, Taiji Adachi: A Novel Graphene Oxide Based Protein Interaction Measurement Using AFM. The 24<sup>th</sup> International Conference on Molecular Electronics & Devices(2013.5.15-16. Daejeon, Korea)
- 韓 成雄, 森田恭平, 安達泰治: AFM を用いたアクチンフィラメントの曲率依存的な ARP2/3 との相互作用変化測定. 第36回日本バイオレオロジー学会年会(2013.6.6-8. 博多)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, Taiji Adachi: Biomechanical Simulation of Multicellular Tissue Morphogenesis: Effects of Apical Contractility on Epithelial Curvatures. The 8<sup>th</sup> International Symposium of the Institute Network, and The Symposium of the Research Core for Transdisciplinary Collaboration on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, "Frontiers in Medical Science and Engineering for Regenerative Medicine"(2013.6.27-28. Kyoto)
- 佐藤正明, 安達泰治, 上岡 寛, 神崎 展: 物理刺激に対する筋骨格系細胞の形態的および機能的応答解析. 第25回日本運動器科学会(2013.7.6. 神戸)
- Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Linear Elastic Behaviors of  $\beta$ -catenin Revealed by AFM-based SMFS. 35<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS) in conjunction with 52<sup>nd</sup> Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering (JSMBE) (2013.7.3-7. Osaka)
- Hiroshi Fujimoto, Junko Sunaga, Taiji Adachi, Yasuhiro Inoue: Mechanical Stimulus Affects mRNA Expression of Mouse Embryonic Stem Cells during Differentiation Process. 35<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS) in conjunction with 52<sup>nd</sup> Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering (JSMBE) (2013.7.3-7. Osaka)
- Taiji Adachi, Masaaki Murata, Junko Sunaga: Mechanosensing Characteristics of Osteocytic Cell Processes – Nitric Oxide Production Induced by Local Mechanical Stimulus. The 19th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2013) (2013.8.25-28. Patras, Greece)
- Sung-Woong Han, Kyohei Morita, Taiji Adachi: Measurement of Actin Filament-Arp2/3 Interaction Change by a Mechanical Factor Using AFM. The 7<sup>th</sup> Asian Pacific Conference on Biomechanics(2013.8.29-31. Seoul, Korea)
- Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Mechanical Properties of  $\beta$ -catenin revealed by SMFS. The 7<sup>th</sup>

- Asian Pacific Conference on Biomechanics(2013.8.29-31. Seoul, Korea)
- Tetsuya Fujii, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Actin-cofilin Interaction Energetically Relates to Promoting Actin Filament Disassembly. The 7<sup>th</sup> Asian Pacific Conference on Biomechanics(2013.8.29-31. Seoul, Korea)
- Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Actin-myosin Catch Bond Promotes Actomyosin Aggregate Formation. The 7<sup>th</sup> Asian Pacific Conference on Biomechanics(2013.8.29-31. Seoul, Korea)
- Taiji Adachi, Kentaro Takenaka, Yasuhiro Inoue: Modeling Spatiotemporal Regulation of Trabecular Bone Remodeling. The 7<sup>th</sup> Asian Pacific Conference on Biomechanics(2013.8.29-31. Seoul, Korea)
- 奥田 覚, 井上康博, 永樂元次, 笹井芳樹, 安達泰治: 細胞頂端面の収縮性が成長する上皮組織の曲率に及ぼす影響: リバーシブル・ネットワーク・リコネクション・シミュレーションによる検討. 日本機械学会年次大会(2013.9.10-12. 岡山)
- 上岡 寛, 亀尾佳孝, 安達泰治: 骨細管イメージモデルを用いた流れ解析. 日本機械学会年次大会(2013.9.10-12. 岡山)
- 三好洋美, Ko Jong Soo, 安達泰治, 山形 豊: 細胞運動を操作する機能性マイクロ構造化表面の設計手法の開発. 日本機械学会年次大会(2013.9.10-12. 岡山)
- 牧功一郎, 韓 成雄, 安達泰治: 原子間力顕微鏡を用いた $\alpha$ -カテニンの単分子力学測定. 日本機械学会年次大会(2013.9.10-12. 岡山)
- 藤井徹矢, 井上康博, 安達泰治: コフィリン修飾アクチンフィラメントの隣接サブユニット間エネルギー地形. 日本機械学会年次大会(2013.9.10-12. 岡山)
- 竹中健太郎, 井上康博, 安達泰治: 骨梁・オステオンにおける BMU の移動: リモデリングシミュレーションによる解析. 日本機械学会年次大会(2013.9.10-12. 岡山)
- Yoshitaka Kameo, Yamamoto Ryuta, Ootao Yoshihiro, Masayuki Ishihara, Hiroshi Kamioka, Taiji Adachi: Modeling Flow-induced Deformation of Osteocyte Process in Canaliculi. V International Conference on Computational Bioengineering(ICCB2013) (2013.9.11-13. Leuven, Belgium)
- 木田直樹, 安達泰治: 有限要素法による生体軟部組織の再構築シミュレーション. 日本機械学会 M&M2013 材料力学カンファレンス(2013.10.12-14. 岐阜)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Taiji Adachi, and Yoshiki Sasai: Three-dimensional Vertex Model for Biomechanical Simulations of Multicellular Dynamics during Tissue Morphogenesis. Quantitative Biology of Signaling, Institut des Etudes Scientifiques de Cargese(2013.10.21-26. Corsica, France)
- Hiromi Miyoshi, Takuma Kishimoto, Takehiko Inaba, Miki Nishimura, Michiko Sugawara, Jong Soo Ko, Taiji Adachi, Toshihide Kobayashi, Yutaka Yamagata: Actin Dynamics in Cells Cultured on Engineered Microtopographical Substrate. The 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan(2013.10.28-30. Kyoto)
- 山本隆太, 亀尾佳貴, 大多尾義弘, 石原正行, 上岡 寛, 安達泰治: 骨細管内の微細構造を考慮した骨細胞突起変形シミュレーション. 日本機械学会第 24 回バイオフィロンティア講演会(2013.11.1-2. 京都)
- 渡辺惟史, 奥田 覚, 井上康博, 安達泰治: 拡散性生化学因子を考慮した上皮組織形態形成の力学シミュレーション. 日本機械学会第 24 回バイオフィロンティア講演会(2013.11.1-2. 京都)
- 田中孝明, 須長純子, 安達泰治: mES 細胞からの眼杯形成に対する細胞外基質の影響. 日本機械学会第 24 回バイオフィロンティア講演会(2013.11.1-2. 京都)
- 玉木嵩人, 韓 成雄, 安達泰治: AFM を用いた骨系細胞における膜タンパク質検出技術の開発. 日本機械学会第

24 回バイオフロンティア講演会(2013.11.1-2. 京都)

藤本博志, 須長純子, 安達泰治, 井上康博: マウス ES 細胞分化過程の mRNA 発現に力学刺激が及ぼす影響. 日本機械学会第 5 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム(2013.11.5-7. 仙台)

平松竜司, 松岡俊樹, 木村-吉田千春, 韓 成雄, 持田京子, 安達泰治, 高山秀一, 松尾 勲: External Mechanical Cues Establish the Anterior-posterior Axis Polarity in Early Mouse Development. 第 36 回日本分子生物学会年会(2013.12.3-6. 神戸)

Daisuke Tawara, Ken Nagura, Tetsuya Tsujikami, Taiji Adachi: Estimation of Changes in Mechanical Bone Quality by Multi-scale Analysis with Remodeling Simulation. The 15th International Conference on Biomedical Engineering(ICBME 2013) (2013.12.4-7. Singapore)

Taiji Adachi, Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue: Computer Simulation of Tissue Morphogenesis Based on Multicellular Dynamics. The 15th International Conference on Biomedical Engineering(ICBME 2013) (2013.12.4-7. Singapore)

Yasuhiro Inoue, Tetsuya Fujii, Taiji Adachi: Tensile-force-induced Propeller-twist Change of Actin Subunits in Actin Filament. 5<sup>th</sup> Asia Pacific Congress on Computational Mechanics & 4<sup>th</sup> International Symposium on Computational Mechanics(APCOM2013/ISCM2013) (2013.12.11-14. Singapore)

## 2) 講演・シンポジウム

安達泰治: 骨の構造・機能適応のマルチスケールバイオメカニクス: 骨細胞から骨梁形態まで. 愛媛医工学連携セミナー(2013.1.31. 松山) (Seminar)

安達泰治: 細胞バイオメカニクス研究: 力学-生化学連成による機能制御. 生物医工学サロン第 51 回集会(2013.2.7. 京都) (Seminar)

安達泰治: 骨細胞の力学刺激応答と骨リモデリングのバイオメカニクス. 医工学フォーラム 2012 年度特別学術講演会(2013.2.27. 京都) (Forum)

安達泰治: 骨の階層的な構造・機能適応の数理バイオメカニクス. 骨と Ca クラスター: 抗老化のための栄養科学と骨疾患克服セミナー(2013.3.6. 徳島) (Seminar)

Taiji Adachi: Biomechanical Studies on Actin Filament Dynamics Regulated by Mechano-chemical Couplings. International Symposium on Nanomedicine Molecular Science, Insights into Intracellular Molecular Reactions: Aiming for Innovation of Medical Cares by Integration of Chemistry, Physics, and Biology(2013.3.10. Kobe) (Symposium)

Taiji Adachi, Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue: Biomechanical Simulation of Tissue Morphogenesis Based on Multicellular Interactions. International Symposium on Bio Medical Engineering Interface(2013.3.14-15. Sendai) (Symposium)

Taiji Adachi: Bone as a Smart Material with Structural Optimality. Egypt-Japan University of Science and Technology(E-JUST)Seminar(2013.5.14. Alexandria, Egypt) (Lecture)

Taiji Adachi: Cellular and Molecular Biomechanics: Mechano-chemical Couplings. Kickoff Symposium: Research and Education Platform for Innovative Research on Dynamics Living Systems Based on Multi-dimensional Quantitative Imaging and Mathematical Modeling(2013.5.23. Kyoto) (Symposium)

安達泰治: 骨の代謝と機能的適応の数理バイオメカニクス. 第 17 回臨床骨代謝フォーラム(2013.6.22. 東京) (In-

vited Talk)

安達泰治, 竹中健太郎, 亀尾佳貴, 井上康博: 骨の構造・機能適応ダイナミクスの数理バイオメカニクス: 骨系細胞間の相互作用. 第33回日本骨形態計測学会, ワークショップ2「医歯工連携による骨組織関連研究」(2013.7.4-6. 浜松) (Workshop)

安達泰治: 生体システムの構造・機能適応ダイナミクスの力学的理解. ウィルス研・再生研講演会(2013.7.25. 京都) (Seminar)

Taiji Adachi: Bone as a Smart Composite Material with Structural Optimality. The 18<sup>th</sup> Composites Durability Workshop(CDW-18) (2013.9.29-10.1. Sendai) (Invited Talk)

安達泰治: 細胞システムによる組織のかたちづくり: 数理バイオメカニクス. 第2回イノバイオシステム研究会セミナー「生体組織再生研究の最前線」生命システムの基礎研究を基盤とした組織再生テクノロジー(2013.10.21. 本郷) (Invited Talk)

Yasuhiro Inoue, Satoru Okuda, Tetsuya Fujii, Kohei Ohto, Taiji Adachi: Computational Biophysics on Epithelial Tissue Deformation: From Molecular to Tissue Scale. Biophysical Views in Structural Cell Biology, the 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan(2013.10.28-30. Kyoto) (Symposium)

Sung-Woong Han, Koichiro Maki, Yoshinori Hirano, Toshio Hakoshima, Taiji Adachi: Mechanical Evaluation of Molecules at Adherens Junction using AFM. Biophysical Views in Structural Cell Biology, the 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan(2013.10.28-30. Kyoto) (Symposium)

井上康博: アクチン細胞骨格系のマルチスケール計算バイオメカニクス. 神戸大学計算科学専攻第7回協定講座シンポジウム「ロボティクスとバイオメカニクスの計算科学的接点」(2013.12.2. 神戸) (Invited Talk)

井上康博, 奥田 覚, 渡辺惟史, 安達泰治: 形態形成における力学-生化学連成を考慮した3次元組織変形の数理モデリング・シミュレーション. 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「新しいメカノバイオロジーを目指す工学と生物学の融合」(2013.12.3-6. 神戸) (Invited)

Taiji Adachi: Mechanoregulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Migrating Cells. ナノプラットフォーム NSF セミナー(2013.12.13. 京都) (Seminar)

## 技 術 部

### Division of Technical Support

#### 【研究支援概要】

2013 年は 1 月より 12 月末までに 6 分野 86 件の利用があり、再生実験試料等の特殊な組織標本作製なども含め、個々の研究者の要望に添えてきた。また、固定、包埋から染色、封入までの病理組織標本作製などの技術指導、クリオスタットの共同利用者への凍結切片作製の指導も行ってきた。

- ・パラフィン切片作製、凍結切片作製、ブロックの作製、脱灰標本の作製
- ・一般染色 (Hematoxylin-Eosin stain)
- ・特殊染色 (Azan stain, Alcian blue stain, Berlin blue stain, Dahl's method, Elastica-Van Gieson stain, Giemsa stain, Kluver-Barrera stain, Masson's trichrome stain, Maxwell's stain, Nissl's stain, PTAH, Toluidine blue stain, Safranin O-Fast green stain, Villanueva bone stain, von Kossa's method, Silver stain)

また、実験病理指導認定士として実験病理技術研究会等で技術指導を行った。



## 4. 学術集会

### 京都大学再生医科学研究所 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」 平成 25 年度 学術講演会

開催日：2013 年 12 月 25 日(水)

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会の挨拶 所長 岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所)

#### セッション 1

座長：松岡 雅雄(京都大学ウイルス研究所 所長)

「マウス精子の受精能獲得分子機構のダイナミズム」

近藤 玄(京都大学再生医科学研究所 教授)

「マウス精子形成を支える幹細胞の正体とその動態」

吉田 松生(大学共同利用機関法人自然科学研究機構 基礎生物学研究所 教授)

ポスターセッション

#### セッション 2

座長：吉崎 武尚(京都大学大学院工学研究科 教授)

「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法(ABMi)の現状と将来展望」

坂井田 功(山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学 教授)

「細胞分裂の軸を決めるメカニズムと細胞分化・組織構築における意義」

豊島 文子(京都大学ウイルス研究所 教授)

「細胞膜に見るメゾスケール分子組織化と機能の原理：超 1 分子イメージングによる解明」

楠見 明弘(京都大学再生医科学研究所 教授)

閉会の挨拶 副所長 開 祐司(京都大学再生医科学研究所)

【ポスターセッション】

ポスター 1

小胞体からのタンパク質逆行輸送メカニズム

How misfolded proteins are exported from the ER?

細川 暢子(細胞機能調節学分野)

ポスター 2

Probing the function of Drosophila GAGA factor in transcription apparatus by RNA aptamers

転写複合体に含まれるショウジョウバエ GAF の RNA アプタマーによる機能解析

法邑 賢一, 平芳 一法(細胞機能調節学分野)

ポスター 3

マウス T 細胞レセプター  $\beta$  鎖遺伝子 D2-J2 領域は本当に再構成しにくいのか?

藤本 真慈(細胞機能調節学分野)

ポスター 4

幹細胞培養および組織再生をターゲットとした生理活性因子機能化足場材料の創製

戸田 裕之, 山本 雅哉, 田畑 泰彦(生体材料学分野)

ポスター 5

幹細胞の遺伝子改変および再生治療の生体イメージングのための生体適合性ナノ複合体の創製

城 潤一郎, 田畑 泰彦(生体材料学分野)

ポスター 6

Manipulating cell sorting in MSC/islet multicellular spheroids

Ian T. Hoffecker(組織修復材料学分野)

ポスター 7

筋再生時に白血球で発現する Adam8 の機能解析

西邨 大吾(再生増殖制御学分野)

ポスター 8

CRISPR/Cas9を用いたプロモーター配列挿入による簡便なノックアウト・レスキューシステムの構築とその幹細胞研究応用

松永 太一(幹細胞分化制御研究分野)

ポスター 9

精子成熟因子としての自然免疫因子リポカリン 2

渡邊 仁美(附属再生実験動物施設)

ポスター 10

骨梁と皮質骨のリモデリングシミュレーション：力学刺激感知機構とシグナル伝達機構の影響

竹中健太郎(バイオメカニクス研究領域)

## 京都大学再生医科学研究所「若手発表会」

開催日：2013年12月25日(水)

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会の挨拶 所長 岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所)

セッション1 座長：徳増 雄大(再生増殖制御学分野)，増田 喬子(再生免疫学分野)

EP2 アゴニストを用いた変性軟骨再生治療法の開発

福田 誠(組織再生応用分野)

iPS細胞技術を用いたLMP2抗原特異的T細胞の再生

前田 卓也(再生免疫学分野)

HLAハプロタイプホモドナーからヘテロへの移植における免疫反応の検証と制御法の開発

一瀬 大志(再生免疫学分野)

生理活性因子配向固定化ハイドロゲルを用いた間葉系幹細胞のサンドイッチ培養

戸田 裕之(生体材料学分野)

セッション2 座長：一瀬 大志(再生免疫学分野)，飯田 敦夫(再生増殖制御学分野)

1分子観察によるGPCRの過渡的2量体の発見と機能解明

笠井 倫志(ナノバイオプロセス研究領域)

Transient raft-dependent multimolecular complexes including integrin and FAK are the platforms for IP3 signaling of GPI-anchored receptors Raft-facilitated signal transduction of GPI-anchored receptors mediated by transient recruitment of integrin and FAK: elucidation by single-molecule imaging(インテグリンとFAKを含む短寿命多分子複合体ラフトがGPIアンカー型受容体のIP3シグナルを誘起するプラットフォームとなるGPIアンカー型受容体のラフト依存的シグナル変換を担うインテグリンとFAKとの過渡的相互作用：1分子追跡による解明)

角山 貴昭(ナノバイオプロセス研究領域)

AFMナノフィッシングによる細胞間メカノセンサの力学的挙動解析

牧 功一郎(バイオメカニクス研究領域)

材料の表面特性と細胞接着性タンパク質吸着および細胞接着の関係

有馬 祐介(組織修復材料学分野)

セッション3 座長：牧 功一郎(バイオメカニクス研究領域)，有馬 祐介(組織修復材料学分野)

Analysis of biological association of LBX1 with AIS (adolescent idiopathic scoliosis)-like spinal deformity in zebrafish

郭 龍(Guo Long)(生体分子設計学分野)

精子成熟因子としての自然免疫因子リボカリン2

渡邊 仁美(附属再生実験動物施設)

デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来iPS細胞を用いた病態再現

庄子 栄美(再生増殖制御学分野)

遺伝子ノックアウトによる哺乳類配偶子形成関連遺伝子の機能解析

林 瑛理(発生分化研究分野)

近距離無線通信技術を応用した手術用マーキングシステムの開発

小島 史嗣(臓器再建応用分野)

### 【ポスターセッション】

ポスター1

AFMナノフィッシングによる細胞間メカノセンサの力学的挙動解析

牧 功一郎(バイオメカニクス研究領域)

ポスター2

トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた遺伝子機能解析

飯田 敦夫(再生増殖制御学分野)

ポスター3

分子選択的フィルターが神経軸索細胞膜に存在する：超高速1分子追跡による発見

宮原 愛美(ナノバイオプロセス研究領域)

ポスター4

Adaptor transmembrane protein LAT in immune signaling works in vesicles recruited to the plasma membrane: a single-molecule tracking study  
(免疫細胞のシグナルアダプター分子LATの時空間制御機構：1分子追跡による解明)

廣澤幸一郎(ナノバイオプロセス研究領域)

ポスター5

滑膜肉腫における上皮様構造形成機構におけるエピジェネティック制御

日根野 翔(組織再生応用分野)

ポスター6

abT細胞系列とgdT細胞系列への運命決定機構：決定はT細胞受容体非依存的に起こる

河田 岳人(再生免疫学分野)

## 京都大学再生医科学研究所平成 24 年度共同研究報告会

開催日：2013 年 3 月 15 日(金)  
場 所：京都大学再生医科学研究所

### 開会挨拶

岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所 所長)

「上皮間葉相互作用解析のためのマイクロパターン化培養基材の設計」

加藤 功一 教授(広島大学大学院医歯薬保健学研究院)

「膵臓  $\beta$  細胞と  $\alpha$  細胞からなる組織の再構築と再構築組織内での膵細胞の機能評価」

長船 健二 准教授(京都大学 iPS 細胞研究所)

「人工癌幹細胞を用いた上皮-間葉移行能力関連因子群の解析」

近藤 亨 教授(北海道大学遺伝子病制御研究所)

「矯正歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析」

山本 照子 教授(東北大学大学院歯学研究科)

「機能性ハイドロゲルを用いた組織周囲環境の再現と組織形態変化の検討」

松本 卓也 教授(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

「軟骨特異的分子 Chondromodulin-I を用いた骨延長術の促進」

油形 公則 特任助教(徳島大学病院 整形外科)

「キメラマウスを用いた概日時計成立メカニズムの解明」

八木田 和弘 教授(京都府立医科大学大学院医学研究科)

「Mlh1 欠損マウスの胸腺および脾臓に発生する 2 種類のリンパ腫における胎児期被ばくの影響」

柿沼 志津子 チームリーダー(放射線医学総合研究所放射線防護研究センター)

「膵島移植効率向上を目指した移植膵島における膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 X の機能抑制」

大木 理恵子 研究員(国立がん研究センター研究所)

「マウス精子形成を支える幹細胞の自己複製・分化と挙動におけるケモカインの寄与」

吉田 松生 教授(基礎生物学研究所)

### 閉会挨拶

開 祐司(京都大学再生医科学研究所 副所長)

## 京都大学再生医科学研究所 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」 第 8 回公開講演会 種の存続と個体の生存

開催日：2013 年 7 月 20 日(土)  
場 所：京都大学百周年時計台記念館 1 階百周年記念ホール

### 開会挨拶

「意外と謎だらけの受精のはなし」

再生医科学研究所 教授 近藤 玄

「iPS 細胞からがんを殺す T 細胞を再生！」

再生医科学研究所 教授 河本 宏

## 分野主催のセミナー

開催日	講演者・所属	演 題	セミナー名	主催分野
2013. 1.25	小守 壽文 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)	骨格形成における Cbfb の役割	京都大学再生医科学研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2013. 1.31	池川 志郎 (理化学研究所ゲノム医科学研究所研究センター)	運動器疾患のゲノム解析－遺伝子から分子病態へ	京都大学再生医科学研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2013. 2. 8	岩里 琢治 (国立遺伝学研究所形質遺伝研究部門、総合研究大学院大学遺伝学専攻)	新生仔マウス大脳皮質における「パレル形成」in vivo イメージング	細胞機能調節学セミナー	細胞機能調節学分野
2013. 2.22	工藤 明 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)	メダカを用いた骨発生・骨形成の解析：破骨細胞のライブイメージング	京都大学再生医科学研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2013. 3. 8	鄭 雄一 (東京大学大学院工学系研究科軟骨骨発生・再生研究グループ)	骨形成シグナルの解明と人工骨の開発	京都大学再生医科学研究所特別セミナー	生体分子設計学分野
2013. 3.19	川上 浩一 (国立遺伝学研究所)	トランスポゾンを用いた遺伝学とゼブラフィッシュが解き明かす脳のはたらき	再生増殖制御学分野セミナー	再生増殖制御学分野
2013. 4.12	庭野 道夫 (東北大学電気通信研究所)	赤外による細胞動態計測 - バイオアッセイへの応用に目指して -	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2013. 4.12	平野 愛美 (東北大学大学院医工学研究科)	半導体マイクロ加工に基づくイオンチャネルチップの開発	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2013. 5.29	Peter Pivonka (University of Melbourne, Melbourne, Australia)	A Multiscale Systems Biology Approach to Bone Mechanobiology	第13回バイオメカニクスセミナー	バイオメカニクス研究領域
2013. 7.19	伊川 正人 (大阪大学微生物病研究所)	CRISPR/Cas9 人工制限酵素システムを用いたマウスゲノム編集		再生実験動物施設
2013. 7.22	入江 直樹 (理化学研究所発生・再生科学総合研究センター)	個体発生は系統発生を反復しない？	再生増殖制御学分野セミナー「進化に関するふたつのセミナー」	再生増殖制御学分野
2013. 7.22	細 将貴 (京都大学白眉センター)	右利きのヘビ仮説：追うヘビ、逃げるカタツムリの右と左の共進化	再生増殖制御学分野セミナー「進化に関するふたつのセミナー」	再生増殖制御学分野
2013. 7.29	朝倉 淳 (Stem Cell Institute, Paul & Sheila Wellstone Muscular Dystrophy Center, Department of Neurology, University of Minnesota Medical School)	骨格筋幹細胞の自己複製の分子機構と血液ニッチ	再生増殖制御学分野セミナー	再生増殖制御学分野
2013. 9.27	川上 浩一(国立遺伝学研究所)	Genetic visualization and control of the neuronal activity in the zebrafish brain	Cell Biology, Developmental Biology, and Systems Biology Course Meeting	再生増殖制御学分野
2013.10. 1	田口 明彦 (先端医療振興財団)	脳梗塞患者に対する細胞治療の現状とその展望	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2013.10.11	Jöns Hilborn (Materials Chemistry, Uppsala University)	Formation of Bone from Injectable Biomaterials	組織修復セミナー	組織修復材料学分野
2013.11.13	Yuhang Chen (Heriot-Watt University, Edinburgh, UK)	Tissue Mechanics: from Microstructure to Function - Our current work on tissue diagnostics using engineering approaches	第14回バイオメカニクスセミナー	バイオメカニクス研究領域
2013.12.17	佐藤 勝彦 (理化学研究所発生・再生科学総合研究センター)	One Possible Mechanism of Collective Migration of Epithelial Cells	第15回バイオメカニクスセミナー	バイオメカニクス研究領域



## 学術講演会・シンポジウム・研究会

(再生増殖制御学分野)

**German-Japan Colloquium Cellular Biochemistry Shaping Animals, Karlsruhe Institute of Technology**

開催日：2013年1月28～31日

開催場所：Karlsruhe, Germany

### 第19回小型魚類研究会

開催日：2013年9月20～21日

開催場所：仙台市情報・産業プラザ(宮城県仙台市)

### 日本発生生物学会 2013 年秋期シンポジウム

開催日：2013年11月18～20日

開催場所：しあわせの村(兵庫県神戸市)

### Swiss-Kyoto Symposium, Eidgenössische Technische Hochschule

開催日：11月21～22日

開催場所：Zurich, Swiss

## 5. 共同研究

### 2012 年度共同研究報告(研究期間 2012 年 4 月～2013 年 3 月)

#### 【慢性期脊髄損傷の根治的治療法の確立】

○研究代表者：西尾 健資 助教(京都大学大学院医学研究科)

再生医科学研究所共同研究者：中村 達雄 准教授(臓器再建応用分野)

○研究経過及び研究成果：

申請者は、成熟ラット脊髄切断直後にブタ胎仔脳由来液性因子を投与し、切断部を超える軸索再生誘導に成功しているが、今回の共同研究では、中村准教授と相談の上、慢性期脊髄損傷の治療法開発を目指して、成熟ラットに対して脊髄部分損傷の一次手術を行った後に、約 1 ヶ月後に、脊髄瘢痕部の吻側・尾側の 2 箇所切断・瘢痕部切除・断端接合術および断端接合部への胎仔脳由来液性因子投与を実施した(n=10)。結果としては、損傷部を超える軸索再生を認めなかった。理論的には、この術式は脊髄を一カ所で切断して、切断部を直ちに接合して、同部に胎仔脳由来液性因子を投与する急性期実験と同様の効果が期待できるはずであったが、脊髄は神経組織であるために、2 カ所の断端を手術糸によって縫合することが不可能であり、断端接合部の離開・壊死が生じたことが軸索再生失敗の最大の要因と推定された。この結果を中村准教授と相談した結果、この問題を克服すべく、末梢神経の再生では有効性が確立されている polyglycolic acid-collagen (PGA-c) tube を組織欠損部に移入して軸索再生を目指す実験を再度計画しているところである。

また、胎仔脳由来液性因子では有効分子が不明であり実用化は困難であるので、上記実験と並行して、急性期成熟ラット脊髄切断モデルを用いて、既知の活性分子で胎仔脳由来液性因子の代替が可能か否かを検討した。この結果、いくつかの候補分子が同様の効果を持つことが示唆されたが、まだ結論は出ていない。

○研究成果の公表

(上記研究は、未だに結論は出ていないので、学会発表・論文発表はまだである。)

#### 【軟骨特異的分子 Chondromodulin-I を用いた骨延長術の促進】

○研究代表者：油形 公則 特任助教(徳島大学病院整形外科)

再生医科学研究所共同研究者：宿南 知佐 准教授(生体分子設計学分野)

○研究経過及び研究成果：

本共同研究では以下のことを行った。10 週齢の雄 C57BL/6 マウスを用いて骨延長過程における Chondromodulin-I (Chm-I) の遺伝子発現と蛋白質局在を *in situ* hybridization, real-time PCR, 免疫染色を用いて調べ、続いて wild type と *Chm-I*<sup>-/-</sup> マウスとの骨延長過程を軟 X 線像、組織像にて比較した。*Chm-I* mRNA は骨延長術初期の軟骨性仮骨に発現していた。*Chm-I* は II 型コラーゲン陽性軟骨細胞に発現していたが、X 型コラーゲン陽性の肥大軟骨細胞ではその発現が検出されなかった。Chm-I 蛋白質は、軟骨性仮骨周囲の細胞外マトリックスに局在していた。さらに *Chm-I*<sup>-/-</sup> マウスでは、軟骨性仮骨形成障害により延長部の組織は大きく連続性が断たれ、結果的に骨癒合が遅延した。このように、本共同研究により *Chm-I* が骨延長術初期の軟骨性仮骨形成とその後の内軟骨性骨化に必須の働きをしていることが明らかになった。

○研究成果の公表

(現在、上記成果をまとめた論文の投稿を準備中である。)

#### 【脾臓 β 細胞と α 細胞からなる組織の再構築と再構築組織内での脾細胞の機能評価】

○研究代表者：長船 健二 准教授(京都大学 iPS 細胞研究所)

再生医科学研究所共同研究者：岩田 博夫 教授(組織修復材料学分野)

○研究経過及び研究成果：

iPS 細胞から分化誘導した脾 β 細胞と α 細胞の再配置を行い、機能的な脾臓組織を再構築することを目的に研究を開始した。まず、既報の分化誘導法(Kunisada et al, 2012)を改良し、ヒト iPS 細胞から約 10% 程度の効率にてインスリン産生細胞(β 細胞)を安定して分化誘導可能となった。そして、低分子化合物のスクリーニングを行い、ヒト iPS 細胞から β 細胞への誘導効率を 2

倍程度に向上させる化合物を同定した(投稿準備中)。次に、ヒト iPS 細胞由来  $\beta$  細胞の再配置実験を可能とするために  $\beta$  細胞を生存させたまま単離できる INSULIN 遺伝子座に緑色蛍光蛋白質(GFP)を相同組み換え法にて遺伝子導入したレポーターヒト iPS 細胞株(INSULIN-GFP knockin ヒト iPS 細胞)を樹立した。今後、 $\alpha$  細胞のマーカー遺伝子である GLUCAGON のレポーターヒト iPS 細胞株(GLUCAGON-tdTomato knockin ヒト iPS 細胞)の樹立も行い、それらのレポーターヒト iPS 細胞株を用いて、岩田研究室と共同でヒト iPS 細胞から分化誘導した  $\alpha$  細胞と  $\beta$  細胞の再配置実験を行う予定である。

○研究成果の公表

<発表論文>

1. Yasushi Kondo, Taro Toyoda, Michinori Funato, Yoshiya Hosokawa, Tomomi Sudo, Nobuya Inagaki and Kenji Osafune.  
Establishment of the differentiation method from human iPS cell into pancreatic  $\beta$  cell using low-molecular-weight compounds. (投稿準備中)
2. 近藤恭士, 稲垣暢也, 長船健二  
「ヒト ES 細胞, iPS 細胞の heterogeneity と再生医療に与える影響」内分泌・糖尿病・代謝内科(科学評論社)36(3): 242-248, 2013.
3. 長船健二  
「iPS 細胞の臨床応用の見通し」日本医事新報(日本医事新報社)No. 4628: 46-47, 2013.1.5
4. 長船健二  
「iPS 細胞を用いた糖尿病に対する再生医療開発に向けた取り組み」遺伝子医学 MOOK22(メディカルドゥ社)153-7, 2012.

<学会発表>

船戸道徳, 豊田太郎, 近藤恭士, 細川吉弥, 須藤智美, 沖田圭介, 浅香勲, 上杉志成, 加藤善一郎, 太田章, 山中伸弥, 近藤直実, 長船健二.

「病態解析に向けたヒト iPS/ES 細胞から膵外分泌細胞への高効率分化誘導法の開発」

第 12 回日本再生医療学会, 横浜, 2012 年 3 月 21 日.

#### 【機能性ハイドロゲルを用いた組織周囲環境の再現と組織形態変化の検討】

○研究代表者: 松本 卓也 教授(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

再生医科学研究所共同研究者: 山本 雅哉 准教授(生体材料学分野)

○研究経過及び研究成果:

天然多糖であるアルギン酸ナトリウムは水に可溶性であり、カルシウムイオンなど 2 価の陽イオンの存在によりキレート結合しゲル化する。この性質を利用し、アルギン酸ナトリウムの濃度を変えることで、堅さの異なるアルジネートゲルを作製した。この堅さは 1-200 kPa であり、これら堅さは生体内組織の堅さ、脳など神経系の柔らかい組織から、類骨など堅めの組織を反映した値である。この堅さの異なる環境で唾液腺組織を培養したところ、堅さが堅いと唾液腺成長が抑制され、柔らかいと成長が促進することが明らかとなった。さらにそのメカニズムを検討したところ、唾液腺構成細胞が柔らかい環境では FGF7, 10 といった増殖因子をよく発現していることが明らかとなった。

一方、フィブロネクチンは一般的には細胞接着に關与するタンパク質として知られているが、唾液腺組織の分岐においても、このタンパク質の存在が重要な働きを示すことが報告されている。そこで、フィブロネクチンに存在する細胞接着モチーフである RGD を基本としたペプチドを合成、アルジネートゲルにアミド結合により固定化した。このゲル材料は細胞接着性が高くなっており、RGD の固定化が確認された。このゲルにおけるペプチド固定化条件、特に固定ペプチド濃度を変え、唾液腺組織を培養したところ、より詳細な腺組織形態制御が可能となった。また、培養基材としてではなく、組織への局所作用を目指しペプチド固定化ゲルビーズを作製し応用した。その結果、腺組織局所での成長制御の可能性も示された。

○研究成果の公表

<発表論文>

Hiroaki Taketa, Yasuhiro Torii, Masaya Yamamoto, Yoshiaki Hirano, Yasuhiko Tabata, Takuya Matsumoto. Peptide-based synthesized platform for modulating in vitro gland tissue morphogenesis. (In preparation)

Hiroaki Taketa, Yasuhiro Torii, Masaya Yamamoto, Yoshiaki Hirano, Yasuhiko Tabata, Takuya Matsumoto. Peptide-immobilized

hydrogel beads for modulating in situ gland tissue morphogenesis. (In preparation)

### 【神経・グリア相互作用に基づく神経回路形成とその維持機構の解明】

○研究代表者：川上 浩一 教授(国立遺伝学研究所)

再生医科学研究所共同研究者：瀬原 淳子 教授(再生増殖制御学分野)

○研究経過及び研究成果：

神経ネットワークの構築は、神経細胞だけではなく、オリゴデンドロサイトやアストロサイトなどのグリア細胞や血管・ミクログリアなどの細胞が形成や維持機構に関与する。申請者は、世界に先駆けてゼブラフィッシュを用いた遺伝子トラップ法・エンハンサートラップ法による神経回路網の可視化、及びその形成に関与する遺伝子の大規模スクリーニングと解析を行ってきた。本研究においては、この系を利用して、共同研究者瀬原のグループと、増殖因子やプロテアーゼの働きを中心に、脳形成に関わる細胞・遺伝子、分子機構の解明をめざし、そのひとつとして、次のような研究結果を得た。この研究結果は、現在投稿中である。

神経細胞の産生は、発生過程において、高次脳機能を獲得する上で必須な最初の段階である。神経細胞は、基本的に2つの段階を経て産生されることが考えられる。第1に、神経幹細胞から神経前駆細胞が産生される段階、第2に、神経前駆細胞が分裂して非増殖性の神経細胞を産生する段階である。神経発生においては、様々な細胞内や細胞外の分子機構が明らかにされているが、第2段階である、神経前駆細胞から分裂後の神経細胞を産生する過程については、ほとんど明らかにされていない。

そこで瀬原と共同して、ゼブラフィッシュの視蓋を脊椎動物の脳のモデル系として、まず、神経細胞がどのように時間的空間的に分化してくるかを検討した。神経特異的転写因子プロモーターの下流にGFPを発現させたトランスジェニックゼブラフィッシュ、Tg(*brn3a-hsp70 : GFP*)あるいはTg(*neurod : GFP*)、Tg(*huC : Kaede*)を用いて神経発生を観察した結果、神経細胞の分化は、時間的にも空間的にも極めて緻密に制御されたプロセスであることがわかった。神経前駆細胞から神経細胞の産生は、stochasticに起こるのではなく、basal側から始まり、apical側へと進行する。このような進行の規則性の機構を解明する手がかりとして、我々は、ErbBシグナリングに着目した。

ErbBシグナルは、増殖、分化、移動など、細胞の挙動を制御する多能な制御因子である。ErbB4やそのリガンドのひとつニューレグリン1は、成人の高次脳機能の精神疾患である統合失調症の感受性遺伝子でもある。本研究では、1)ErbB4およびそのリガンドのひとつニューレグリン1のアイソフォームのひとつが、転写因子*neurogenin1*を発現する神経前駆細胞から*neurod*を発現する神経細胞の産生・神経分化に関与すること、2)このニューレグリン1のアイソフォームは、主に、radial glial cellで発現するが、その細胞外ドメインの分布は神経細胞が産生される時期になると、basal側を含め、脳内に広く分布する、そして3)subventricular領域で、神経前駆細胞のErbB4のリン酸化を介して、神経細胞を産生する細胞分裂に関与することを見いだした。

このことをさらに確かめるため、ErbBインヒビターを用いて、その神経産生を阻害し、インヒビター除去により神経再生を再開させたときの3次元の神経発生を、タイムラプスにより、時間を追って4次元で解析した。これを行うために、radial gliaで活性化されるGal4発現型のトラップライン SAGFF(LF)81Cを用いた。これにTg(*brn3a-hsp70 : GFP*)を掛け合せ、そこにUAS:*membGFP/UAS : cyto RFP* : UASでドライブされる膜-GFP/細胞質RFPを活性化するプラスミドをインジェクトし、それでラベルされる前駆細胞の挙動を観察した。その結果、インヒビター助成により、確かにSV領域における細胞分裂が活性化され、新しく産生された細胞は、より早く分化した神経細胞のapical側に追加されることが見いだされた。このように、これまで分かっていなかった、神経前駆細胞から神経細胞が産生されるためには、細胞間シグナリングとしてErbBシグナルが重要な役割を果たすという、新たな知見を得ることができた。(Sato T. et al, 投稿中)。

また、別の2系統に関してトランスポゾン挿入部位の遺伝子を同定した。その結果、一つ目は、増殖因子のレセプター遺伝子内にGal4が挿入され、そのホモ個体は、内耳神経のモデルとされる側線神経系を含む、神経系構築の異常を示した。もう一つは、側線神経のターゲットである有毛細胞を含めた感覚受容器(側線)で発現している。これらに関しても現在検討中である。

○研究成果の公表

<発表論文>

- (1) An *mnrb/hlxb9lb* enhancer trap line that labels spinal and abducens motor neurons in zebrafish. Asakawa, K., Higashijima, S.-i., and Kawakami, K. **Developmental Dynamics** 241, 327-332 (2012).

- (2) Connexin 39.9 protein is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S.E., Cui, W.W., Zhou, W., Sprague, S.M., Asakawa, K., Muto, A., Kawakami, K., and Kuwada, J.Y. **Journal of Biological Chemistry** 287(2), 1080-1089 (2012).
- (3) Neuronal birth order identifies a dimorphic sensorineural map. Pujol-Martí, J., Zecca, A., Baudoin, J.P., Faucherre, A., Asakawa, K., Kawakami, K., and López-Schier, H. **The Journal of Neuroscience** 32(9), 2976-2987 (2012).
- (4) Transgenic line with gal4 insertion useful to study morphogenesis of craniofacial perichondrium, vascular endothelium-associated cells, floor plate, and dorsal midline radial glia during zebrafish development. Nakayama, S., Ikenaga, T., Kawakami, K., Ono, F., and Hatta, K. **Development, Growth and Differentiation** 54(2), 202-215 (2012).
- (5) The ciliary protein Nek8/Nphp9 acts downstream of Inv/Nphp2 during pronephros morphogenesis and left-right establishment in zebrafish. Fukui, H., Shiba, D., Asakawa, K., Kawakami, K., and Yokoyama, T. **FEBS Letter** 586, 2273-2279 (2012).
- (6) A zebrafish model of intrahepatic cholangiocarcinoma by dual expression of hepatitis B virus X and hepatitis C virus core protein in liver. Liu, W., Chen, J.R., Hsu, C.H., Li, Y.H., Chen, Y.M., Lin, C.Y., Huang, S.J., Chang, Z.K., Chen, Y.C., Lin, C.H., Gong, H.Y., Lin, C.C., Kawakami, K., and Wu, J.L. **Hepatology** 56, 2268-2276 (2012).
- (7) Mechanism of pectoral fin outgrowth in zebrafish development. Yano, T., Abe, G., Yokoyama, H., Kawakami, K., and Tamura, K. **Development** 139, 2916-2925 (2012).
- (8) Visualization and exploration of Tcf/Lef function using a highly responsive Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-reporter transgenic zebrafish. Shimizu, N., Kawakami, K., and Ishitani, T. **Developmental Biology** 370, 71-85 (2012).
- (9) Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of Gal4-UAS system. Umeda, K., Shoji, W., Sakai, S., Muto, A., Kawakami, K., Ishizuka, T., and Yawo, H. **Neuroscience Research** (2012).
- (10) Functional assessment of human coding mutations affecting skin pigmentation using zebrafish. Tsetskhladze, Z.R., Canfield, V.A., Ang, K.C., Wentzel, S.M., Reid, K.P., Berg, A.S., Johnson, S.L., Kawakami, K., and Cheng, K.C. **PLoS ONE** 7, e47398 (2012).
- (11) Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. Yamanaka, I., Miki, M., Asakawa, K., Kawakami, K., Oda, Y., and Hirata, H. **Genes to Cells** (2013).
- (12) Real-time visualization of neuronal activity during perception. Muto, A., Ohkura, M., Abe, G., Nakai, J., and Kawakami, K. **Current Biology** 23, 307-311 (2013).
- (13) Innervation is required for sense organ development in the lateral line system of adult zebrafish. Wada, H., Dambly-Chaudière, C., Kawakami, K., and Ghysen, A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** (2013).

<学会発表>(全て口頭発表)

- (1) Kawakami, K., Pradeep, L., and Hiratani, M. Genetic dissection of the adult zebrafish brain by the Gal4-UAS method. "Imaging Structure and Function in the Zebrafish Brain", UK (2012).
- (2) Kawakami, K. The transposon-mediated genetic methods in zebrafish and their application to the study of functional neural circuits. "Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2012", Taiwan (2012).
- (3) Kawakami, K. Tol2-mediated transgenesis, gene trapping, enhancer trapping and Gal4-UAS methods. "Janelia workshop on zebrafish genetics, transgenesis, and systems biology", USA (2012).
- (4) Muto, A., Ohkura, M., Abe, G., Nakai, J., and Kawakami, K. Real-time visualization of the neuronal activity in the brain during visual perception of a natural object. "10th International Conference Zebrafish Development and Genetics", USA (2012).
- (5) Kawakami, K. The transposon-mediated genetic methods in zebrafish and their application to the study of functional neural circuits: transgenic tools for calcium imaging. "The 2012 Cold Spring Harbor Asia Conference Zebrafish Disease Models", China (2012).

【*Mih1* 欠損マウスの胸腺および脾臓に発生する2種類のリンパ腫における胎児期被ばくの影響】

○研究代表者：柿沼 志津子 チームリーダー(放射線医学総合研究所放射線防護研究センター)



再生医科学研究所共同研究者：藤本 真慈 助教(細胞機能調節学分野)

#### ○研究経過及び研究成果：

胎児期・小児期の放射線被ばくによる小児白血病の増加が報告されているが、その生物学的メカニズムはよく分かっていない。放射線は、細胞死などを起こすことにより組織の構築を破綻させ、がんを誘発すると考えられている。造血組織においては、複数種類の細胞が協働して機能しており、その構築が未分化な時期における被ばくが、その後のリンパ腫(Tリンパ腫とBリンパ腫)の起源や分化段階にどのように影響するのかを明らかにすることを目的とした。

本研究では、DNA ミスマッチ修復遺伝子である *Mlh1* 欠損マウスを用いた。DNA ミスマッチ修復(MMR)遺伝子の欠損は、複製時に生じるミスマッチによってがん関連遺伝子にフレームシフトや点突然変異を蓄積する。*Mlh1* ヘテロ欠損はヒトの遺伝性非腺腫症性大腸癌の原因であり、ホモ欠損では小児のTまたはB細胞白血病を発症することが報告されている。我々はこれまでに、*Mlh1* ホモ欠損マウスは自然誘発または生後のX線照射で胸腺リンパ腫を高頻度に発症すること、胸腺リンパ腫の細胞では胸腺細胞の増殖分化に重要な転写因子である Ikaros が高頻度にフレームシフト変異していることを明らかにしている(Kakinuma, Oncogene, 2007)。

本共同研究では、*Mlh1* ホモ欠損マウスの胎児期照射による発がん影響を解析し、非照射群に比べて胸腺リンパ腫の発生率・発生時期共に差は認められないが、脾臓リンパ腫の発症時期が早くなることが分かった。そこで、胎児期照射によって誘発された胸腺と脾臓に発生する2種類のリンパ腫について TCR $\alpha$  鎖遺伝子座、TCR $\beta$  鎖遺伝子座及び IgH 鎖遺伝子座の組換えについて解析した。その結果、脾臓リンパ腫において V $\beta$  gene segment の使用に偏りがあり、TCR $\alpha$  鎖遺伝子の塩基配列に共通性があることが明らかになった。胎児期被ばくによるリンパ腫の発生には年齢特異的メカニズムが存在することが示唆された。

#### ○研究成果の公表

##### <発表論文>

1. S. Kakinuma, M. Nishimura, Y. Amasaki, M. Takada, K. Yamauchi, S. Sudou, Y. Shang, K. Doi, S. Yoshinaga, Y. Shimada : Combined exposure to X-irradiation followed by N-ethyl-N-nitrosourea treatment alters the frequency and spectrum of Ikaros point mutations in murine T-cell lymphoma, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis: A Section of Mutation Research, 737(1-2), 43-50, 2012
2. S. Hirano, S. Kakinuma, Y. Amasaki, M. Nishimura, T. Imaoka, S. Fujimoto, O. Hino, Y. Shimada : Ikaros is a critical target during simultaneous exposure to X-rays and N-ethyl-N-nitrosourea in mouse T-cell lymphomagenesis, International Journal of Cancer, 132(2), 259-268, 2013

##### <学会発表>

1. M. Sunaoshi, Y. Amasaki, S. Hirano, T. Takabatake, T. Morioka, M. Nishimura, Y. Shimada, A. Tachibana, S. Kakinuma : Age dependency of Ikaros and Pten alterations in radiation-induced T-cell lymphoma, Childhood Cancer 2012 –International scientific conference on early exposure and childhood cancer–, London, 2012.04
2. S. Kakinuma, M. Takimoto, S. Fujimoto, Y. Amasaki, S. Hirano, S. Kito, Y. Oota, M. Fukushi, Y. Shimada : Effects of in utero radiation exposure on lymphomagenesis in *Mlh1*-deficient mice, Childhood Cancer 2012 –International scientific conference on early exposure and childhood cancer–, London, 2012.04
3. 柿沼志津子：子どもの放射線発がん感受性の謎に迫る，放射線防護研究センターシンポジウム，千葉，2012.03
4. 柿沼志津子，甘崎佳子，平野しのぶ，澤井知子，西村まゆみ，島田義也：低線量放射線と化学発がん物質との複合曝露による発がん影響，第39回日本毒性学会学術年会，宮城県仙台市，2012.07
5. 柿沼志津子：幼若期被ばくの影響，日本放射線影響学会ワークショップ，福島県郡山市，2012.10
6. Y. Shimada, M. Nishimura, K. Daino, T. Imaoka, Y. Yamada, S. Takeda, Y. Amasaki, Y. Shang, T. Sawai, S. Hirano, K. Iwata, T. Morioka, C. Tsuruoka, B. Blyth, S. Tani, A. Hosoki, K. Ariyoshi, T. Kokubo, Y. Ishida, S. Kakinuma : Age dependent radiation sensitivity to carcinogenesis of mice and rats, NIRS International Symposium in collaboration with IAEA, Chiba, 2012.12
7. Y. Shimada, M. Nishimura, K. Daino, T. Imaoka, Y. Yamada, S. Takeda, Y. Shang, Y. Amasaki, T. Sawai, K. Iwata, T. Kokubo, Y. Ishida, S. Kakinuma : Age dependence of radiation carcinogenesis in mouse and rat models, The 25th International Symposium Foundation for Promotion of Cancer Research "Radiation and Cancer", Tokyo, 2012.12
8. 藤本真慈，柿沼志津子，島田義也：TCR $\beta$  鎖遺伝子の asynchronous rearrangement は常に成立しているか？ Kyoto T Cell

Conference, 第22回学術集会, 京都, 2012.07

9. S. Fujimoto, S. Kakinuma: Detecting an aberrant V(D)J recombination, a hybrid joint, in murine thymic lymphomas, 第41回日本免疫学会学術集会, 神戸, 2012.12
10. S. Fujimoto, S. Kakinuma Y. Shimada: Effects of X-ray irradiation on murine TCR $\gamma$  chain gene rearrangement, 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012.12

#### 【膵島移植効率向上を目指した移植膵島における膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子Xの機能抑制】

○研究代表者: 大木 理恵子 研究員(国立がん研究センター研究所)

再生医科学研究所共同研究者: 角 昭一郎 准教授(器官形成応用分野)

○研究経過及び研究成果:

膵臓はその約9割以上は外分泌腺が占め、その中に内分泌細胞が集まる膵島が島のように浮かんで存在している組織である。膵島細胞が腫瘍化すると膵内分泌腫瘍となり、一方で膵島の機能が破綻し、インスリン分泌が異常になると糖尿病を発症する。糖尿病患者の治療として、膵臓移植より患者の体への負担が少ないという事で膵島移植が行われている。日本においては臓器提供者が少ないため、より高い膵島の生着率が望まれており、膵島細胞を増殖させる、あるいは膵島細胞の細胞死を抑制する方法が模索されている。

我々は、これまで機能未知であった遺伝子Xが、p53によって誘導される遺伝子である事を見だし、Xがp53によるAkt抑制を担う重要な遺伝子である事を世界で初めて明らかにした。遺伝子Xは、細胞膜に存在するイノシトールリン脂質(PIPs)との結合に働くPHドメインのみから構成されるタンパク質をコードしている。一方、AktもPHドメインを持つタンパク質であり、活性化にはPHドメインを介して細胞膜に局在する事が必須である。Xは、Aktのいわば内在的に発現するdominant negative体として機能し、AktとPIPsとの結合を直接阻害する。その結果、Aktの細胞膜局在は阻害され、下流の生存シグナルは伝達されない。

がん抑制において、非常に強いがん化促進能を持つAktの活性を制御する事はとても重要である。実際にXの発現を抑制した細胞ではAktの異常な活性化が認められるとともに、細胞ががん化(足場非依存性の増殖能を獲得)している事が示され、Xはがん抑制能を有する事が示された。さらに、ヒト肺及び膵内分泌腫瘍において遺伝子Xの高頻度な欠損が認められた。これらのがん組織では正常組織と比較してXの発現低下とAkt活性の上昇が認められ、Xが内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子として機能していると考えられた。

一方で、Xが膵内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子であるという事から、Xが膵内分泌細胞の増殖を制御するのではないかと考え研究を進めている。これまでに膵島β細胞由来の細胞株RIN細胞、正常膵島細胞を用いて、膵β細胞においてXが細胞増殖とAkt活性を抑制している事を明らかにした。

さらにはX欠損マウスにおいて膵島の過形成が認められており、Xは膵島細胞の増殖を抑制する事が示された。

これまでに角昭一郎准教授との共同研究によって、分離膵島から得た膵島細胞を用い、Xが膵島細胞において細胞増殖の抑制、アポトーシス誘導に機能する事を明らかにした。

今後さらに膵島機能にXがどのように関わるのか解析を進める事で、糖尿病研究、膵島移植に役立つ成果を得る事が可能である。さらにはX機能を抑制した膵島を作り出し、再生医療の分野に役立てたいと考えている。

○研究成果の公表

<学会発表>

・口頭発表

1. 第71回日本癌学会学術総会, シンポジウム発表, 2012.9

大木理恵子「X is a p53-regulated repressor of Akt」

2. 第35回日本分子生物学会年会, ワークショップ発表, 2012.12

大木理恵子「XはAktの新規抑制因子をコードする内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子である」

・ポスター発表

1. 第2回日中がん研究シンポジウム会, ポスター発表, 2012.5

Pancreatic islet hyperplasia in mice deficient for X, a candidate tumor suppressor gene of endocrine tumors

## 2. 第 35 回日本分子生物学会年会, ポスター発表, 2012.12

Akt 抑制遺伝子 X は新規腺内分泌腫瘍抑制遺伝子である

～X 遺伝子欠損マウスにおける腭ランゲルハンス島細胞の過形成～

## 【キメラマウスを用いた概日時計成立メカニズムの解明】

○研究代表者：八木田 和弘(京都府立医科大学大学院医学研究科)

再生医科学研究所共同研究者：近藤 玄 准教授(附属再生実験動物施設)

○研究経過及び研究成果：

我々は、概日時計の発生メカニズムの解明を目的として本共同研究を提案した。概日時計のリズム発振は受精卵や初期胚には見られず、出生後にはほぼ全ての体細胞で概日時計の発振が見られることから、哺乳類概日時計は発生・胎生期に形成されることが示唆されている。しかし、胎生期のどの時期にどのようなメカニズムで概日時計振動体が形成され、自律振動をはじめるのかは現在まで分かっていない。

これまでに我々は、マウス ES 細胞をモデル系として利用し、細胞分化誘導技術と遺伝子操作技術を駆使した、哺乳類概日時計発生過程の解析を行った。マウス ES 細胞を培養下で分化誘導を行い、ルシフェラーゼを指標とした概日時計振動の発光イメージング法によって、細胞分化過程における概日時計振動の解析に成功した。さらに、一度分化させた細胞を、iPS 細胞作製技術を利用してリプログラミングを誘導し、概日時計振動体の変化を解析した。これらの結果から、概日時計の発生は、細胞ひとつひとつのレベルで自律的にプログラムされていることを明らかにした(Yagita et al, PNAS, 2010)。この結果を踏まえ、さらに、生体レベルでの概日時計の発生を理解するには、「細胞レベルの内在性プログラム」と「環境要因」の関係も含めた統合的研究が必須になる。我々は、概日時計の発生メカニズムを、マウス胚を用いた発生工学とイメージング技術を駆使して、統合的に理解することを目的としている。

平成 24 年度の共同研究では、概日時計の周期に異常を来す遺伝子変異 ES 細胞に概日時計をモニターできる蛍光ルシフェラーゼを用いた発光レポーターを導入し、これをマウス胚盤胞にインジェクションして、キメラマウスを作製した。このキメラマウスの E13.5 胚より MEF を採取し、変異 ES 細胞由来の MEF が示す概日リズムを解析した。その結果、変異 ES 細胞由来の MEF では野生型 MEF に比べて有意な周期異常が確認された。この周期異常は in vitro でこの変異 ES を分化誘導したときに形成される概日時計の周期異常と同様であった。これらの結果から、in vitro での分化誘導でも、in vivo の発生過程における遺伝子変異に伴う概日リズムの周期異常を再現できることが確認できた(論文投稿中)。

○研究成果の公表

## ・論文

Kazuhiro Yagita, Yasuhiro Umemura Masashi Wada, Junko Yoshida, Yoshiki Tsuchiya, Yutaka Inada, Hitomi Watanabe, Gen Kondoh, Junji Takeda, Hiroshi Ito, Hitoshi Inokawa, Kyoji Horie, In vitro circadian clock formation assay with mutant ES cells. (Submitted)

## ・学会発表

&lt;招待講演&gt;

- 1) 八木田和弘, ES/iPS 細胞の体内時計研究への応用, 産業総合技術研究所セミナー, 高松, 2012 年 4 月 27 日
- 2) Kazuhiro Yagita, ES cell-based assay system for analyzing the circadian phenotypes in mammals. UTSouthwestern Medical Center seminar, Dallas, USA. 2012, May, 17.
- 3) 八木田和弘, ES/iPS 細胞で解く体内時計の成立原理, 岡山大学理学部セミナー, 岡山, 2012 年 7 月 19 日
- 4) 八木田和弘, 体内時計の発生・発達・老化および疾患との関連, ニューロサイエンスセミナー, 京都, 2012 年 7 月 12 日
- 5) 八木田和弘, 体内時計の発生・発達, 久留米大学小児科学セミナー, 久留米, 2013 年 2 月 27 日
- 6) 八木田和弘, 分化に伴う細胞自律的な哺乳類概日時計の発生とその破綻, 東北大学脳科学研究センター講演会, 仙台, 2012 年 12 月 10 日

&lt;学会発表・特別講演等&gt;

- 1) Kazuhiro Yagita, Cell-autonomous development of mammalian circadian clock during the differentiation culture of ES cells. International Conference for Histochemistry and Cytochemistry 2012, Kyoto, 2012, Aug. 29.

- 2) 八木田和弘, 発生発達期における概日リズムの階層的形成, 第17回行動神経内分泌研究会, 京都, 2012年8月30日
- 3) 八木田和弘, 体内時計の発生・発達, 第1回日本発達神経科学会, 明石, 2012年9月9日
- 4) Kazuhiro Yagita, ES cell-based approach elucidating the integrated physiology of mammalian circadian systems. 4th International Symposium on Photoc Bioimaging 2012, Sapporo, 2012, Sep. 17.

<学会発表・シンポジウム>

- 1) 八木田和弘, 時間軸生物学: 細胞分化と概日時計の接点, 第12回日本抗加齢医学会総会, 横浜, 2012年6月22日(オーガナイザー)
- 2) Kazuhiro Yagita, ES cell-based in vitro evaluation system of circadian clock phenotypes in mammals, 第35回日本分子生物学会ワークショップ(オーガナイザー), 横浜, 2012年12月14日.
- 3) 八木田和弘, 発生発達期における概日リズムの階層的形成, 第90回日本生理学会シンポジウム(オーガナイザー), 東京, 2013年3月27日

【人工癌幹細胞を用いた上皮—間葉移行能力関連因子群の解析】

○研究代表者: 近藤 亨 教授(北海道大学遺伝子病制御研究所)

再生医科学研究所共同研究者: 加藤 友久 講師(組織再生応用分野)

○研究経過及び研究成果:

本研究では, 申請者らが樹立した人工マウスグリオーマ幹細胞(GIC)株とヒトグリオーマ由来 GIC 濃縮細胞塊を用いた網羅的な遺伝子発現解析から抽出した micro RNA 340 (miR340)の機能解析を行った.

現在までに, (1)miR340 の発現は, 非癌細胞(正常神経幹細胞を含む)で発現が高く, マウスおよびヒト GIC で抑制されていること, (2)ヒトグリオーマ組織においても miR340 の発現が抑制されていること, (3)miR340 の強制発現は, GIC の細胞増殖および運動能を抑制し, 細胞老化形質を誘導すること, (4)miR340 の新たな標的遺伝子として plasminogen activator, tissue (PLAT) を決定した. これらの研究成果をもとに論文作成中である. また, miR340 が他癌腫の腫瘍形成を阻害できるかどうかについても検討する予定である.

○研究成果の公表

<論文>

Daisuke Yamashita, Norihiro Ohnishi, Toru Kondo miR340 inhibits tumorigenesis of glioma-initiating cells by targeting plasminogen activator system. In preparation.

(山下大介氏の学位論文として提出予定)

<学会発表>

山下大介<sup>1</sup>, 近藤亨<sup>2</sup>, 高橋寿明<sup>2</sup>, 井上明宏<sup>1</sup>, 高野昌平<sup>1</sup>, 原田広信<sup>1</sup>, 大上史朗<sup>1</sup>, 久門良明<sup>1</sup>, 田中潤也<sup>2</sup>, 大西丘倫<sup>1</sup>(2012)グリオーマ形成に関わる新規 microRNA の性状解析. 日本脳腫瘍学会

【上皮間葉相互作用解析のためのマイクロパターン化培養基材の設計】

○研究代表者: 加藤 功一 教授(広島大学大学院医歯薬学総合研究科)

再生医科学研究所共同研究者: 岩田 博夫 教授(組織修復材料学分野)

○研究経過及び研究成果:

(1)緒言

複雑な構造をもつ器官の発生機序を理解し, また, そのような器官を人工的に構築するには, 上皮間葉相互作用に基づく器官原基発生の再現が重要であると考えられる. しかしながら, 上皮および間葉の二種類の細胞を同一の基材上に播種して培養すると両者が混在した共培養系となり, 細胞集団同士の相互作用を分析するのは容易ではない. そこで本研究では, 京都大学再生医科学研究所・岩田博夫教授と共同して, 上皮細胞と間葉細胞を両者のミクロな相対位置を制御しながら共培養する手法の開発に取り組んだ. すなわち, 基板材料の微細加工および細胞に親和性のある生体分子の部位特異的固定化によって培養基材を作製し, 二種類の細胞を構成的に微細配置することを試みた. 固定化生体分子として, 細胞表面マーカーを特異的に認識する抗体, ならびに, インテグリンと結合する細胞外マトリックスに注目した. それらを部位特異的に固定化した表面を用いて, 上皮細胞およ



び間葉細胞を異なる部位に接着させることが可能であるかについて調べた。

## (2) 実験

**細胞：**上皮細胞としてマウスの歯肉上皮細胞株(GE1)を用い、間葉細胞としてマウス間葉系幹細胞株(C3H10T1/2 clone 8)を用いた。

**表面マーカー発現解析：**我々が間葉系幹細胞分析用に開発してきた抗体アレイを用いて、GE1細胞およびC3H10T1/2 clone 8細胞に発現する表面マーカーを分析した。解析には、CD11b, CD31, CD44, CD45, CD51, CD73, CD90, CD105, CD254に対する抗体およびコントロールとしてIgGが配列固定された抗体アレイを用いた。GE1細胞およびC3H10T1/2 clone 8をトリプシン処理によって培養皿から回収した後、1 mg/mL  $\gamma$ グロブリンおよび0.53 mM EDTAを含むリン酸緩衝食塩水(PBS)に分散させた。これらの細胞分散液をアレイ上に滴下し、37℃で静置した。30 min後、細胞が結合したスポットを調べ、表面マーカー発現に関する情報を得た。

**インテグリン発現解析：**GE1細胞およびC3H10T1/2 clone 8に発現するインテグリンについてRT-PCR法により調べた。調査したインテグリンは、 $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_v$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_6$ の11種類である。内部標準にはハウスキープ遺伝子であるGAPDHを用いた。

**固体固定基材の作製：**二種類の抗体(抗CD73抗体および抗CD105抗体)を図1に示す方法でガラス基板の異なる部位に吸着させた。その基材上にGE1細胞およびC3H10T1/2 clone 8細胞を播種して部位特異的な培養を試みた。また、二種類の抗体が部位特異的に吸着されることを調べるため、Alexa Fluor 488あるいはphycoerythrin(PE)をコンジュゲートしたモデル抗体を上記と同様の方法で基材上に吸着させた。

**細胞外マトリックス固定基材の作製：**GE1細胞およびC3H10T1/2 clone 8細胞に対して特異的に結合する細胞外マトリックスの組み合わせを選択するため、ラミニン-1、フィブロネクチン、I型コラーゲン、ゼラチンを表面に固定したガラス基材をそれぞれ作製した。これらの基材上にGE1細胞およびC3H10T1/2 clone 8細胞を播種し、細胞接着性について評価した。

さらに、円形の窓をもつシリコンシートを利用して、ラミニン-1およびゼラチンを異なる領域に配置した基材を作製し、その基材上にGE1細胞およびC3H10T1/2 clone 8細胞を播種して部位特異的な培養を試みた。

## (3) 結果および考察

**表面マーカー固定化抗体間の相互作用を利用した共培養：**抗体アレイ分析法を用いて、GE1細胞およびC3H10T1/2 clone 8細胞に発現する表面マーカーを調べた。その結果、図2に示すように、CD73はGE1細胞に発現するが、C3H10T1/2 clone 8細胞には発現していないことがわかった。これとは逆に、CD105はGE1細胞には発現しないが、C3H10T1/2 clone 8細胞に発現することがわかった。以上の結果から、抗CD73抗体および抗CD105抗体を用いることによって、それぞれの細胞を特異的に認識できるものと考えられた。

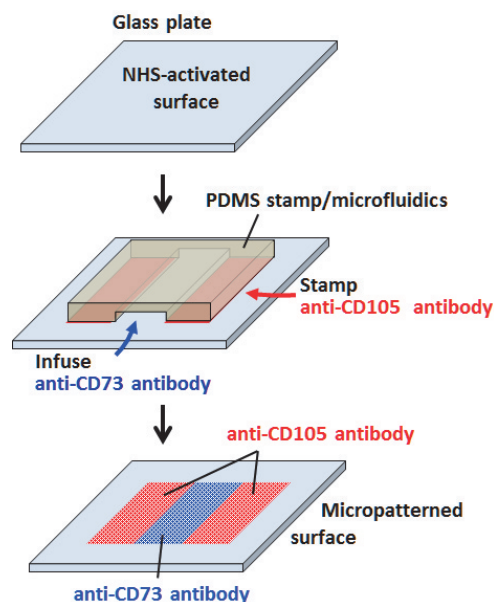


図1. 抗体の部位特異的吸着の方法。

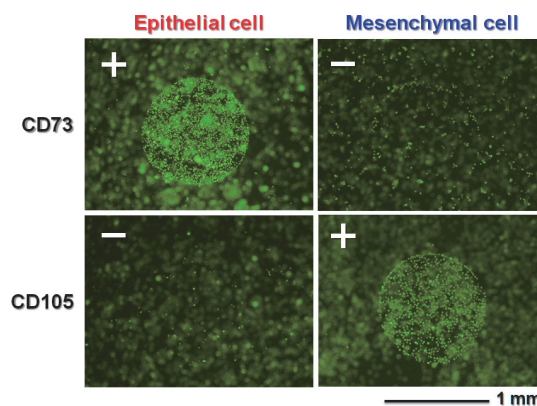


図2. 抗体アレイ法による細胞表面マーカー発現解析の結果。CD73およびCD105について示す。

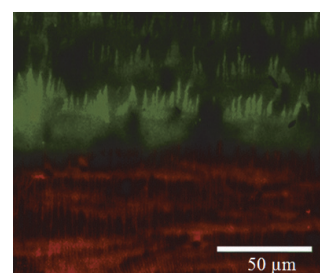


図3. 2種類の抗体を部位特異的に吸着させた基材表面の蛍光顕微鏡写真。緑：Alexa Fluor 488 標識抗体、赤：PE 標識抗体。



次に、図1に示す方法で2種類の抗体を基材上の異なる部位に吸着させる方法について検討した。スタンプに塗布する抗体溶液量、圧着力、流路内に注入する抗体溶液の濃度等の条件を最適化した結果、図3に示すように、2種類の抗体(Alexa Fluor 488 および PE で標識された抗体)を近接した部位に限局してそれぞれ吸着させることができた。

上記の検討によって最適化された抗体吸着条件を用いて、抗 CD73 抗体および抗 CD105 抗体を基材上に吸着させた。この表面に GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 細胞の混合懸濁液を滴下した。なお、両細胞を区別するため、予め C3H10T1/2 clone 8 細胞を赤色蛍光を有する PKH26 で染色した。結果を図4に示す。図4A からわかるように、細胞は均一に分布していた。一方、図4B からわかるように、C3H10T1/2 clone 8 細胞は、抗 CD105 抗体を吸着させた部位に(図中の点線より下側)のみ接着し、抗 CD73 抗体を吸着させた部位(図中の点線より上部)には見られなかった。この結果は、抗 CD73 抗体および抗 CD105 抗体を部位特異的に吸着させた基材を用いることによって、それらの領域に対応した上皮・間葉細胞共培養が可能であることを示している。しかしながら、位相差顕微鏡像と蛍光顕微鏡像を比較した場合、未染色の細胞(GE1 細胞)が抗 CD105 抗体吸着領域にも存在することがわかる。これは GE1 細胞が抗 CD105 抗体吸着領域へ非特異的に接着したためであると考えられ、より明確に区画を分けて共培養を行うには、細胞の非特異的接着を抑えるための改良が必要である。

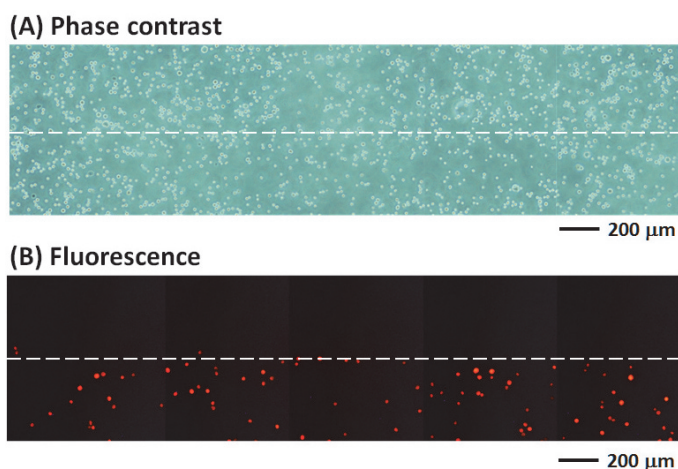


図4. 抗 CD73 抗体および抗 CD105 抗体を部位特異的に吸着表させた基材上への上皮・間葉細胞の接着。  
(A)位相差顕微鏡写真、(B)間葉細胞(赤)の蛍光顕微鏡写真。(A)と(B)は同一視野。

インテグリン-細胞外マトリックス間の相互作用を利用した共培養：第二の方法として、インテグリンの発現パターンの違いを利用して、空間的に制御された培養系を作ることを試みた。

まず、GE1 細胞および C3H10T1/2 clone 8 細胞に発現しているインテグリンの種類を RT-PCR 法によって調べた。図5に示すように、上皮細胞(GE1 細胞)では、とくに  $\alpha 6$  および  $\beta 4$  インテグリンの発現が特徴的であった。これらが複合体を作るとラミニン-1に対して比較的親和性が高いことが知られている。一方、間葉細胞(C3H10T1/2 clone 8)では  $\alpha 1$  および  $\beta 1$  インテグリンの発現が比較的顕著であった。これらからなる複合体は I 型コラーゲンに対して親和性の高いことが知られている。

次に、各種の細胞外マトリックスに対する細胞の接着性を調べた。細胞外マトリックスとして、ラミニン-1、ファイブロネクチン、I 型コラーゲン、I 型コラーゲンの変性物であるゼラチンを用いた。それらを異なる基板上に固定して細胞の接着実験を行った。その結果を図6に示す。GE1 細胞はラミニン-1に比較的良好に接着した。一方、C3H10T1/2 clone 8 細胞はコラーゲンやゼラチンによく接着することがわかった。これらの結果は、インテグリンの発現パター

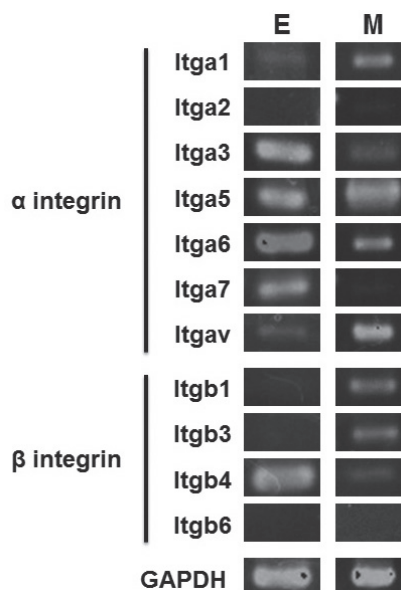
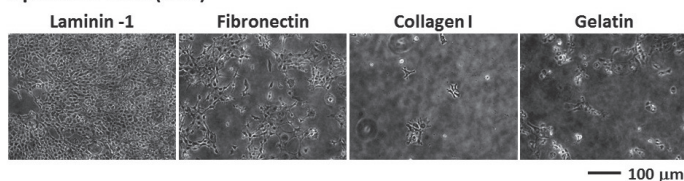


図5. RT-PCR 法によるインテグリン発現解析結果。  
E: GE1 細胞(上皮), M: C3H10T1/2 clone 8 細胞(間葉)。

## Epithelial cells (GE1)



## Mesenchymal cells (C3H10T1/2 clone 8)

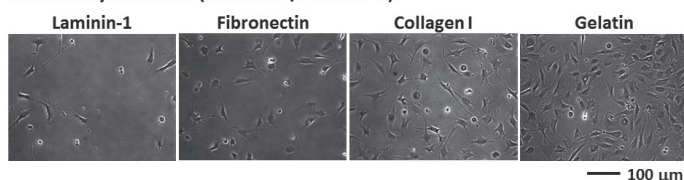


図 6. 各種の細胞外マトリックス固定化表面へ接着した上皮および間葉細胞の位相差顕微鏡像。

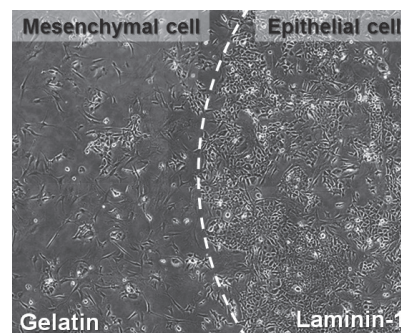


図 7. ラミニン-1 とゼラチンを部位特異的に固定した基材表面で培養した上皮および間葉細胞の位相差顕微鏡像。

ンから予想される細胞外マトリックス特異性と一致する。

上記の実験結果を踏まえて、上皮および間葉細胞に対して特異的に結合する細胞外マトリックスとしてラミニン-1 およびゼラチンの組み合わせを選択した。それらを特定部位かつ近接させて配置した基材を作製し、上皮・間葉細胞を播種した結果(図 7)、上皮および間葉細胞が対応する細胞外マトリックス上に選択的に接着した。ただし、細胞接着の選択性は十分には高くなかった。これは、インテグリン-細胞外マトリックス間相互作用の特異性の低さに起因しているものと推測される。

## (4)まとめ

上皮および間葉の細胞集団をそれらの相対位置を制御しながら共培養するには、細胞特異的な表面マーカーあるいはインテグリンを認識する抗体あるいは細胞外マトリックスを基板上の特定部位に配置する方法が有効であることがわかった。

細胞の部位特異性をさらに向上させるための方策として、マイクロコンタクトプリンティング法のような微細加工技術を用いて、より精度の高い空間制御を行うことが有効であると期待される。また、カドヘリン-カドヘリン間のホモフィリックな相互作用のように、特異性が高くかつ強力な結合力を利用する方法も効果的であると予想される。

## ○研究成果の公表

## &lt;発表論文&gt;

- 1) Nakaji-Hirabayashi T, Kato K, Iwata H, In vivo study on the survival of neural stem cells transplanted into the rat brain with a collagen hydrogel that incorporates laminin-derived polypeptides, *Bioconjugate Chemistry*, submitted.

## 【矯正的歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析】

○研究代表者：山本 照子 教授(東北大学大学院歯学研究科)

再生医科学研究所共同研究者：開 祐司 教授(生体分子設計学分野)

○研究経過及び研究成果：

本研究では *Scleraxis* (*Scx*) 発現領域で GFP が検出されるレポーターマウスである *ScxGFP Tg* を用いて生理的な歯周組織での解析を行った。本年度は、主に *Scx* と *Osterix* (*Osx*) の発現局在に着目し、これらの転写因子が生理的なメカニカルストレスの影響下でどのような発現パターンを示すのかについて詳細に解析した。更に、*Sox9Cre* の knock-in マウスとレポーターマウスである *Ail4* マウスを交配して *Sox9Cre; Ail4* を作成し、歯と歯周組織における *Sox9* 陽性細胞の系譜を解析した。非脱灰凍結切片は、粘着フィルムを用いた川本法によって作製した。石灰化組織中の蛋白質の抗原部位は、切片を 0.25 M EDTA/PBS に浸漬し、1 時間の脱灰処理を行って露出させた。

蛍光免疫染色による解析の結果、*ScxGFP Tg* の臼歯とその周辺組織では、歯の萌出前である 2 週齢において、歯根膜線維芽細胞の一部で GFP の発現が検出された。一方、*Sox9Cre; Ail4* では、2 週齢において、歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞、象牙芽細胞、エナメル芽細胞、及び歯髄細胞で蛍光蛋白が検出されたことから、*Sox9* 発現細胞は、歯や歯周組織を構成するほぼ全ての細胞に分化していることが明らかとなった。*ScxGFP Tg* では、歯の萌出に伴って GFP の発現が上昇し、4, 6, 8, 及び 12 週齢では、大部分の歯根膜線維芽細胞及び象牙芽細胞において、明瞭な GFP の発現が検出された。野生型マウスで *in situ* hybridiza-

tion によって *Scx* の発現を解析した場合も、同様の結果が得られた。骨芽細胞、セメント細胞及び歯槽骨中の骨細胞においては、低いレベルの GFP の発現が検出されたが、セメント芽細胞では、GFP の発現はほとんど検出されなかった。*ScxGFP* Tg の歯根膜における GFP の発現は、全ての週齢の臼歯において、根尖部付近では低く、歯頸部付近では高い傾向が認められた。GFP と *Osx* の蛍光二重免疫染色の結果、歯根膜の一部では、*Osx* は *Scx* と相補的な発現パターンを示すことが明らかとなった。すなわち、個々の歯根膜細胞において、根尖部では GFP が低く *Osx* が高い発現を認めたが、歯頸部では GFP が高く *Osx* が低い発現様式となっていた。詳細な解析の結果、*ScxGFP* Tg の歯根膜における GFP の発現レベルは、細長く伸展した形態の細胞で高く、圧縮された形態の細胞では低いことが明らかとなった。

次に矯正的な歯の移動モデルである Waldo 法を使って、歯根膜に牽引と圧迫のメカニカルストレスを加えることにより、歯周組織での *Scx* の発現を解析した。この方法では、マウスの上顎左側の第一臼歯と第二臼歯の間に elastic band を挿入し、歯根膜に牽引領域および圧迫領域を生じた。その結果、歯根膜の圧迫側よりも、牽引側で高い GFP の発現が見られた。特に Waldo 法を開始して 48 時間後、水平断切片において、第一臼歯の口蓋根で顕著な差が見られた。牽引側では歯根膜細胞の伸展が見られ、GFP を高いレベルで発現する細胞が増加したのに対し、圧迫側では時間の経過とともに歯根膜細胞の圧縮が見られ、GFP の発現は低下した。従って、*Scx* の発現は、牽引力による歯根膜細胞の伸展により上昇することが明らかとなった。また、牽引側の歯根膜では、TGF- $\beta$  系列のシグナル分子である Smad3 のリン酸化が *Scx* の発現上昇に先立って認められた。さらに歯根膜細胞だけでなく骨芽細胞層やセメント芽細胞層においても Smad3 のリン酸化が認められた。従って、*Scx* はメカニカルストレスに応答性の遺伝子で、生理的及び矯正的な歯の移動において歯周組織のリモデリングに関与していると考えられる。

歯根膜細胞における *Scx* の発現と、メカニカルストレスの関連性を詳しく調べるために培養歯根膜細胞を使って、まず歯根膜細胞における *Scx* の発現を調べた。歯根膜細胞は、抜歯に付いてくる歯根膜組織から、アウトグロースさせることで採取することができる。この細胞における *Scx* の発現をノーザンブロット法により解析すると、腱細胞と同等のレベルで *Scx* を発現していることが明らかとなった。

さらに、*Scx* の発現と TGF- $\beta$  シグナリングの関係を解析するために、培養歯根膜細胞に TGF- $\beta$ 2 を添加して *Scx* の発現を解析した。これまでの実験結果から、ラットの腱細胞では TGF- $\beta$ 2 の添加により *Scx* の発現レベルが上昇することが明らかとなっている。培養歯根膜細胞においても TGF- $\beta$ 2、BMP4、FGF2 を添加し検討した結果、TGF- $\beta$ 2 で最も *Scx* の発現レベルの上昇が認められた。さらに Western blot により解析したところ、TGF- $\beta$  添加に伴い Smad3 のリン酸化が認められた。従って、歯根膜細胞では TGF- $\beta$  に反応して *Scx* の発現レベルが上昇することが明らかとなった。

次に、ストレッチチャンバーを使用し、動物実験モデルにおける牽引力と TGF- $\beta$  シグナリングとの関係や、メカニカルストレスがどのようにして *Scx* の発現レベルに影響を与えるのかについて解析した。培養歯根膜細胞に伸展刺激を与えたところ 1 時間で TGF- $\beta$  シグナリング分子である Smad3 リン酸化の上昇が認められた。また伸展刺激を与えると同時に、TGF- $\beta$  の阻害剤として TGF- $\beta$  soluble receptor を培地に添加すると、TGF- $\beta$  シグナリングの活性化が抑制された。このことからメカニカルストレスによる TGF- $\beta$  シグナリングの活性化にはレセプターを介した細胞外の TGF- $\beta$  が関与していることが明らかとなった。現在は、伸展力を負荷することで *Scx* の遺伝子発現および歯根膜で認められるその他の遺伝子 (*Col1a2*, *Periostin*, *ALP*, *Osx*, *Runx2*, *Twist*) の発現レベルの変化について Real time PCR 法によって解析中である。

さらに *in vitro* 歯根膜細胞における *Scx* と *Osx* の発現を解析した。その結果、*in vitro* においても、*Scx* の発現が低くなる培養条件では *Osx* の発現が高くなることがノーザンブロット解析により明らかとなった。従ってこの 2 つの転写因子が、歯根膜細胞の分化状態の決定に関与している可能性があり、歯根膜細胞は幹細胞ニッチとして多分化能の制御に関与していると考えられる。

#### ○研究成果の公表

##### <発表論文>

##### 1) 歯根膜における Scleraxis の発現と矯正的な歯の移動による変化の解析

川津 正慶

2013 年東北大学歯学博士論文。

##### 論文投稿予定

Aki Takimoto, Masayoshi Kawatsu, Yuki Sugimoto, Masahiro Seiryu, Etsuko Ikeda, Teruko Takano-Yamamoto, Ung-il Chung, Yuji Hiraki, and Chisa Shukunami: Expression of Scleraxis in the periodontal ligament is upregulated by tensile mechanical force. (manuscript in preparation)



## &lt;学会発表&gt;

## 1) 第30回日本骨代謝学会学術集会

日 時：2012年7月19日(木)～21日(土)

演 題：歯根膜における Scleraxis の発現とその制御

Regulation of Scleraxis expression in the periodontal ligament

発表者：滝本 晶

宿南知佐，川津正慶，清流正弘，山本照子，開祐司

## 2) 第13回運動器科学研究会

日 時：2012年9月14日(金)～15日(土)

演 題：歯根膜における Scleraxis の発現と矯正歯の移動による変化の解析

発表者：川津 正慶

## 3) 第71回日本矯正歯科学会

日 時：2012年9月26日(水)～28日(金)

演 題：矯正歯の移動モデルを用いた歯根膜における Scleraxis の機能解析

Functional analysis of Scleraxis in the periodontal ligament during experimental tooth movement.

発表者：川津 正慶

岩崎将也，清流正弘，池田悦子，滝本品，宿南知佐，山本照子

学術大会優秀発表賞受賞

## 4) 第9回 Skeletal Research Meeting

日 時：2012年11月10日(土)

演 題：歯根膜における Scleraxis の発現と矯正歯の移動による変化の解析

発表者：川津 正慶

## 【精原細胞のニッチとしてのセルトリ細胞の遺伝子発現解析】

○研究代表者：森田 隆 教授(大阪市立大学大学院医学研究科)

再生医科学研究所共同研究者：近藤 玄 准教授(附属再生実験動物施設)

○研究経過及び研究成果：

精原細胞は有糸分裂と減数分裂の二種類の分裂形態をとり，さらに精子へと分化，変態を起こす。このような生殖細胞の周囲に存在するセルトリ細胞は生殖細胞に微小環境を与えるニッチとして重要である。我々はいろんな状況におけるセルトリ細胞の遺伝子発現を解析することにより，セルトリ細胞から発せられるシグナルが，常に一定の微小環境を保つものか，あるいは生殖細胞に対して動的に変化するものかを明らかにすることが目的である。

平成22年度において，我々は，精巣を分画して得られたセルトリ細胞に強く発現している遺伝子は，Hvcn1, Endothelin-1, Connexin 43, Slc27A4, Irx-3, Atm, Desmin, Sox9, Cathepsin L, SCF, c-Kit など，これまで，セルトリ細胞で発現が確認されているものも含まれていた。

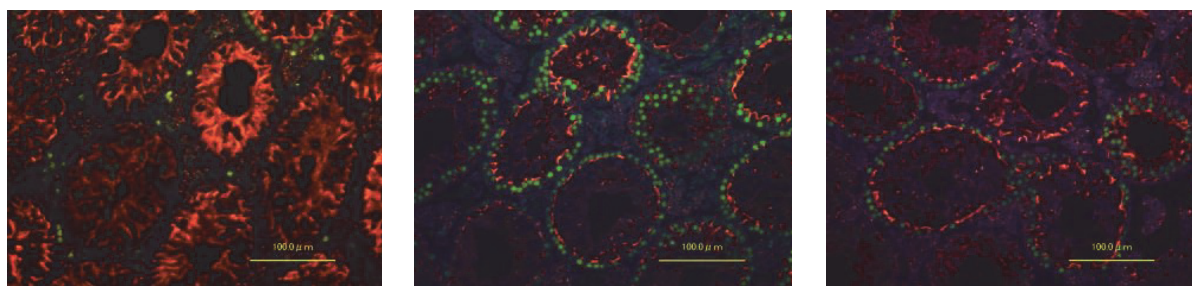


図. 高温によるストレスにより，精子形成の低下とセルトリ細胞の Gap-junction 形成の異常がみられる。Sox9 を緑色で，GJP1(Gap-junction protein 1)を赤色で示した。(x200)左は高温15日後，中央は，常温に戻し，13日後，右は，17日後。

平成 23 年度において、これらのタンパクに対する抗体を用いて、タンパクとしての分布を検討した。実際にセルトリ細胞に特異的に検出されるタンパクとしては、Sox9 が顕著であった。

野生型のマウス精巣を停留辜丸により、高温にし、精子細胞形成を阻害し、そのときのセルトリ細胞における Gap-junction 遺伝子発現を調べた。その結果、下の図に示すように、他、精子形成異常では、セルトリ細胞の Gap-junction の形成はランダムである。しかし、ふたたび、低温で精子形成を再開させると、セルトリ細胞のなかに、生殖細胞が増殖し、分化を始めると通常の細精管の状態を回復するにしたがって、Gap-junction の形成が最外層のセルトリ細胞の接着場所に局在するようになる。このように、高温というストレスであるが、生殖細胞の発生を停止させるとセルトリ細胞にも影響すると考えられる。セルトリ細胞そのものは、高温によるストレスにより、Sox9 遺伝子の発現が抑制されていると考えられる。

○研究成果の公表

<発表論文>

1. Orihashi K, Tojo H, Okawa K, Tashima Y, Morita T, Kondoh G: Mammalian carboxylesterase (CES) releases GPI-anchored proteins from the cell surface upon lipid raft fluidization. *Biol Chem.* 393: 169-76. 2012
2. The Gene Expression of Mouse Sertoli cells (準備中)

<学会発表>

Yoshida, K, Yoshida, S, Eguchi-Kasaai, K, Morita T. Influence of X-ray to Mouse Early Embryos, 第 35 回日本分子生物学会年会  
2012 年 12 月 11 日-14 日, 福岡

#### 【マウス精子形成を支える幹細胞の自己複製・分化と挙動におけるケモカインの寄与】

○研究代表者：吉田 松生 教授(基礎生物学研究所)

再生医科学研究所共同研究者：長澤 丘司 教授(生体システム制御学分野)

○研究経過及び研究成果：

本研究は、ほ乳類精子幹細胞が局在する血管近傍領域付近の体細胞領域にケモカイン分子種が特異的に発現することを切片上の *in situ* ハイブリダイゼーションによって発見したことを大きな根拠として提案し、CXCL12 を含むケモカインが精子形成幹細胞・ニッチシステムにおける機能を解明することを目的として研究を遂行している。

昨年度は、CXCL12 遺伝子座に GFP をノックインしたマウスを用いて、CXCL12 発現細胞を 3 次元的に可視化し、切片(2 次元)からは得られない形態と局在を明らかにした。その結果、CXCL12 発現細胞は、血管近傍領域に特徴的な扁平な形態をもって局在し、精子幹細胞集団はこの細胞近辺に偏った局在を示した。今年度は、この細胞が特異的に発現する分泌因子を同定し、その突然変異体を解析したところ、精子幹細胞が正常に維持されないことを示唆する結果を得た。世界的に初めて、精子幹細胞の直近でその挙動を制御する「ニッチ細胞」を同定するとともに、そこで機能する因子を明らかにしたと考えている。今後、上記の細胞及び分泌因子、さらにこの細胞で発現するケモカインの機能解析を通して、マウス精子幹細胞を制御する細胞外環境の全容に迫りたい。

○研究成果の公表

論文

T. Sato, T. Yokonishi, M. Komeya, K. Katagiri, Y. Kubota, S. Matoba, N. Ogonuki, A. Ogura, S. Yoshida and \*T. Ogawa

\*Testis tissue explantation cures spermatogenic failure in c-Kit ligand mutant mice.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 16934-16938 (2012)

総説/図書

\*S. Yoshida

Elucidating the identity and behavior of spermatogenic stem cells in the mouse testis.

*Reproduction* 144, 293-302 (2012)

学会発表/講演

招待講演

吉田松生：マウス精子幹細胞の集団動態に見る競合と協調 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会 高松 2013年3月  
28 日-30 日



招待講演

S. Yoshida: Stem cell dynamics of mouse spermatogenesis at a single-cell resolution based on live-imaging, clonal-fate, and theoretical analyses. *The 10th NIBB-EMBL Symposium 2013 Quantitative Bioimaging*, Okazaki, Japan, March 17-19, 2013

セミナー

S. Yoshida: Spermatogenic stem cell functionality in the mouse testis. Gurdon Institute, University of Cambridge, Cambridge, UK, January 10, 2013

招待講演/オーガナイザー

吉田松生: 幹細胞制御機構: ニッチはどこまで解明されたか? 第35回日本分子生物学会 シンポジウム・ワークショップ IW9II 福岡 2012年12月11日-14日

セミナー

吉田松生: マウス精子形成幹細胞の自己複製と分化の集団動態 久留米大学分子生命科学研究科セミナー 久留米 2012年12月10日

研究集会

吉田松生: 哺乳類の精子形成を支える幹細胞の究明第7回 認識と形成研究会 宇都宮 2012年12月1日-2日

セミナー

吉田松生: 岡山大学大学院自然科学研究科第377回生物科学セミナー 継続するマウス精子形成を支える幹細胞の実体と動態 岡山 2012年11月29日

セミナー

吉田松生: マウスにおける雄性配偶子幹細胞の実体と動態を求めて 弘前大学農学部セミナー 青森 2012年11月13日

招待講演

S. Yoshida: Mouse sperm stem cells: their behavior and functionality. *Swiss Japanese Developmental Biology Meeting*, Kyoto, Japan, November 5-8, 2012

招待講演

S. Yoshida: Behaviors and dynamics of the male germline stem cells in the mouse testis. *Mammalian meiosis network, 2012 meeting*, Nice, France, October 11-12, 2012

招待講演

K. Hara, B. Simons and S. Yoshida: A theory for mouse spermatogenic stem cell maintenance based on single cell fate analyses and live imaging. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells*, Cold Spring Harbor, New York, USA, October 2-6, 2012

招待講演

吉田松生: マウス精子形成を支える幹細胞の実体と動態を探る 名古屋大学リーディング大学院リトリート 岡崎 2012年9月10日

招待講演/オーガナイザー

吉田松生: マウス精子形成を支える幹細胞の実体とその動態 第30回日本受精着床学会総会・学術講演会 シンポジウム「精子幹細胞のバイオロジーとその応用」大阪府立国際会議場 2012年8月30日-9月2日

セミナー

S. Yoshida: Dynamics of spermatogenic stem cell population in the mouse testis. University of Turku, Finland, August 28, 2012

招待講演

S. Yoshida: Spermatogenic stem cell functionality in the mouse testis. *Scandinavian Physiological Society Annual Meeting*, Helsinki, Finland, August 24-26, 2012

研究集会

吉田松生: 数理統計的にみたマウス精子幹細胞システム 第5回生殖研究若手の会 三浦 2012年7月26日-28日

招待講演/オーガナイザー

S. Yoshida: How are the Self-renewal and Differentiation of Mouse Spermatogenic Stem Cells Balanced? *The 58/60th NIBB Conference "Germline"* Okazaki, Japan, July 17-21, 2012

招待講演

吉田松生: 精子形成幹細胞研究の現状と展望 第31回日本アンドロロジー学会シンポジウム1 神戸 2012年6月29日

招待講演/オーガナイザー

S. Yoshida: Spermatogenic Stem cells: their behavior and functionality in the mouse testis. *Symposium 3 Intrinsic and extrinsic control of stem cell systems, Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology*, Kobe, Japan, May 28-31, 2012

セミナー

S. Yoshida: Population asymmetry of the mouse spermatogenic stem cell system. University of Cambridge, Cambridge, April 18, 2012

招待講演

S. Yoshida: In vivo behavior of the mouse spermatogenic stem cells. *Joint Meeting of the British societies for Cell Biology (BSCB), Developmental Biology (BSDB) and the Japanese Society for Developmental Biologists (JSDB)*. Warwick, UK, April 15-18, 2012

その他, 計12件

学会発表

北館 祐: (タイトル未定)マウス精上皮管腔極性化機構の解明 新学術領域研究「上皮管腔組織形成」第1回国際シンポジウム 北海道 2013年6月22日-23日

学会発表

Yu Kitadate: Characterization of mammalian spermatogenic stem cell niche. *The 46th annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB) cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (APDBN)*, Kunibiki Messe, Matsue, Shimane, Japan, May 28-31, 2013

学会発表(ポスター)

Yu Kitadate, A. Maruyama and S. Yoshida: Vasculature-associated cxcl12 positive peritubular cells are important cell types associated with the distribution of spermatogenic stem cells *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells*, Cold Spring Harbor, New York, USA, October 2-6, 2012

招待講演

北館 祐, 丸山亜裕美, 市川理恵, 吉田松生: マウス精子幹細胞を支えるニッチ細胞の探索 日本遺伝学会第84回大会 福岡 2012年9月23日-27日

学会発表(ポスター)

Yu Kitadate, R. Ichikawa, A. Maruyama and S. Yoshida: Characterization of mouse male germline stem cell niche by gene expression profiling using laser capture microdissection. *10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research*, Yokohama, June 13-16, 2012

学会発表

北館 祐: マウス精上皮管腔極性化機構の解明 新学術領域研究「上皮管腔組織形成」第3回領域会議・全体会議 宮城 2012年6月9日-10日

学会発表

北館祐, 市川理恵, 吉田松生: レーザーマイクロダイセクション法によるマウス精子幹細胞ニッチの同定 第34回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2012年12月13日

その他, 計2件

## 2013 年度共同研究課題一覧

## ○短期研究課題

研 究 代 表 者	再生医科学研究所共同研究者	研 究 課 題
八木田和弘 教授 (京都府立医科大学大学院医学研究科)	近藤 玄 准教授 (附属再生実験動物施設)	キメラマウスを用いた概日リズム成立の階層縦断的解析
吉本敬太郎 准教授 (東京大学大学院総合文化研究科)	山本 雅哉 准教授 (生体材料学分野)	非天然型三次元ニッチ形成に基づく脂肪幹細胞の機能制御に関する研究
飯笹 久 助教 (北海道大学遺伝子病制御研究所)	長澤 丘司 教授 (生体システム制御学分野)	RNA 編集酵素 ADAR1 による造血幹細胞増殖・分化制御機構の解明
川上 浩一 教授 (国立遺伝学研究所)	瀬原 淳子 教授 (再生増殖制御学分野)	神経・グリア細胞のライブイメージングによる神経回路形成とその維持機構の解明
鷹野 誠 教授 (久留米大学医学部)	山下 潤 教授 (幹細胞分化制御研究分野)	イオンチャネル遺伝子(HNC4)を指標とした洞房結節型再生心筋の分化誘導
佐々木隆子 助教 (大分大学医学部)	開 祐司 教授 (生体分子設計学分野)	腱・靱帯組織構築ならびにその機能維持における細胞外基質分子 fibulin-4 の役割解明
青木伊知男 チームリーダー (放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター)	田畑 泰彦 教授 (生体材料学分野)	再生治療過程における幹細胞動態の非侵襲的追跡を実現する細胞標識ナノプローブの開発
大木理恵子 研究員 (国立がん研究センター研究所)	角 昭一郎 准教授 (器官形成応用分野)	膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 X の機能抑制を利用した膵島移植効率向上法の確立
寺村 裕治 特任准教授 (東京大学大学院工学系研究科)	岩田 博夫 教授 (組織修復材料学分野)	超薄膜でカプセル化した移植用細胞の免疫隔離能評価
山本 照子 教授 (東北大学大学院歯学研究科)	開 祐司 教授 (生体分子設計学分野)	歯根膜における <i>Scleraxis</i> の発現制御と機能
西 英一郎 特定准教授 (京都大学医学部附属病院)	河本 宏 教授 (再生免疫学分野)	幹細胞の stemness 維持を司る新規分子の研究
神吉 康晴 特任助教 (東京大学先端科学技術研究センター)	山下 潤 教授 (幹細胞分化制御研究分野)	染色体立体構造からのヒト iPS 細胞未分化維持機構へのアプローチ

## ○長期研究課題(2011 年度～2013 年度)

研 究 代 表 者	再生医科学研究所共同研究者	研 究 課 題
吉田 松生 教授 (基礎生物学研究所)	長澤 丘司 教授 (生体システム制御学分野)	マウス精子形成を支える幹細胞の自己複製・分化と挙動におけるケモカインの寄与

## 6. 協議員・教職員・その他構成員名簿

(平成26年1月1日現在)

### ◆ 京都大学再生医科学研究所協議員(所外) ◆

小 西 郁 生 (京都大学大学院医学研究科教授)  
長 田 重 一 (京都大学大学院医学研究科教授)  
吉 崎 武 尚 (京都大学大学院工学研究科教授)  
中 部 主 敬 (京都大学大学院工学研究科教授)  
上 村 匡 (京都大学大学院生命科学研究科教授)

### ◆ 京都大学再生医科学研究所運営委員(所外) ◆

大 隅 典 子 (東北大学大学院医学系研究科教授)  
妙 中 義 之 (国立循環器病研究センター研究所副所長)  
高 戸 毅 (東京大学大学院医学系研究科教授)  
長 田 重 一 (京都大学大学院医学研究科教授)  
西 川 伸 一 (JT 生命誌研究館顧問)  
西 田 幸 二 (大阪大学大学院医学系研究科教授)  
月 田 早智子 (大阪大学大学院生命機能研究科教授)  
黒 坂 昌 弘 (神戸大学大学院医学研究科教授)

### ◆ 京都大学再生医科学研究所教職員等 ◆

所長(兼): 岩 田 博 夫    副所長(兼): 開 祐 司, 安 達 泰 治

### ■ 生体機能学研究部門 ■

#### 〈細胞機能調節学分野〉

准教授: 細川暢子    特定准教授(白眉)(兼: 白眉センター): 山崎正幸    事務補佐員: 今井飛鳥  
大学院生: 藤森 力, 小幡晃一, 宮崎恵里, 室 貴大  
講師: 平芳一法    研究員(研究機関): 法邑賢一  
助教: 藤本真慈

#### 〈生体微細構造学分野〉

(欠員中)

#### 〈生体機能調節学分野〉

客員教授: 坂口志文    助教: 伊藤能永    講師(非常勤): 坂口教子, 大倉永也    教務補佐員: 山本恵津子  
教務補佐員: 松浦真由美    大学院生: 大崎一直

#### 〈生体システム制御学分野〉

教授: 長澤丘司    助教: 杉山立樹    助教: 尾松芳樹    事務補佐員: 笹川郁子    技術補佐員: 西本千晃  
研究員: 中川俊徳    特定研究員: 塩河亜弥    大学院生: 下戸 学, 金成香奈子, 清家正成

#### 〈生体再建学分野(国内客員)〉

(欠員中)

## ■ 生体組織工学研究部門 ■

### 〈生体分子設計学分野〉

教授：開 祐司 客員教授：宿南知佐 講師(非常勤)：近藤 淳、鄭 雄一、小守壽文、池川志郎  
 特定助教(研究拠点)(学際融合教育研究推進センター)：滝本 晶 技術補佐員：杉山弘美、杉本由紀 大学院生：郭 龍  
 特別研究学生：川津正慶 日本学術振興会特別研究員：山下 寛

### 〈生体材料学分野〉

教授：田畑泰彦 准教授：山本雅哉 助教：城 潤一郎 非常勤講師：小川佳宏、中村雅也、金田安史、青木伊知男  
 事務補佐員：吉岡奈美 技術補佐員：吉田久子  
 大学院生：高本智紹、齊藤高志、田島脩平、戸田裕之、KIM Yanghee、田村 亮、有光竜樹、達富幹生、内藤孝二郎、有本晃佑、  
 永田純平、西本慶喜 学部生：岡本寛史、西野哲史、吉本 雄  
 受託研究員：尾崎千紗、駒田行哉、須田 清、小尾奈緒子、高橋素子、藤井健治  
 特定研究員：松井 誠 民間等共同研究員：小河賢史、先崎尊博  
 教育研究機関研究員：鷺尾絢子 日本学術振興会特別研究員：戸田裕之、KIM Yanghee  
 特別研究学生：中島 大 外国人共同研究者：A RONG GAO WA, TRUNG KIEN PHAM, Zhang TianYuan  
 その他：平井健次郎、隅田 仁、森戸亮行、岡野将之、迎田 生、堀場正寛、山崎未奈

### 〈組織修復材料学分野〉

教授：岩田博夫 助教：有馬祐介  
 事務補佐員：鈴木義子 教務補佐員：藤本七恵 大学院生：EGAWA Edgar Yuji、竹本直紘、Ian Torao Hoffecker、  
 板垣 亮、出野 翔、西村勇人、栗原 令、小松光栄、松井利樹  
 学部生：西澤佑馬、平居佑亮、松岡洋佑 特定研究員(学術支援)：児玉智信  
 研究員(学術支援)：中井隆介 研究員(産官学連携)：Nguyen Minh Luan、白水泰昌  
 日本学術振興会特別研究員：小長谷周平、竹本直紘

### 〈生体物性学分野(国内客員)〉

教授：佐藤正明(平成 25 年 3 月まで)、吉田松生(平成 25 年 4 月から)

## ■ 再生統御学研究部門 ■

### 〈再生誘導研究分野〉

(欠員中)

### 〈再生増殖制御学分野〉

教授：瀬原淳子 助教：飯田敦夫 特定助教(研究拠点)(学際融合教育研究推進センター)：佐藤文規  
 特定助教(研究開発施設共用)：佐藤貴彦 事務補佐員：倉澤祥子 技術補佐員：黒田信子、寒川裕之  
 アソシエイト・フェロー：△西邨大吾 大学院生：平向洋介、荒井宏行、庄子栄美、亀崎青沙、津曲和哉、徳増雄大  
 研究生：チェミンヨン

### 〈再生免疫学分野〉

教授：河本 宏 助教：増田喬子 大学院生：前田卓也、河田岳人、青野麻希、永野誠治、一瀬大志  
 研究生：Nicole Koller 技術補佐員：作本和義 事務補佐員：藤井絵理香、小野田由美、池田久美

## ■ 再生医学応用研究部門 ■

### 〈生体修復応用分野〉

教授：高橋 淳 特定拠点助教：◇森實飛鳥 特定助教：△浅田隆太  
 特定研究員：◇土井大輔、◇西村周泰、◇菊池哲広、◇元野 誠 民間共同研究員：◇孫谷弘明 研究員：◇山崎絵海



事務補佐員：◇中村仁美 教務補佐員：◇窪田 慶 技術補佐員：◇小ノ嶋優子，◇谷川麻紀，◇芦田知佳，◇唐子由紀子  
大学院生：五百藏義彦，小芝 泰，佐俣文平，佐野徳隆，陣上直人，勝川美都子，宮脇良文 学部生：中島悠介

〈組織再生応用分野〉

教授：戸口田淳也 講師：加藤友久 事務補佐員：安田尚代，芳野麻里絵 技術補佐員：日下智聖  
大学院生：松本佳久，福田 誠，日根野 翔，松永一仁

〈器官形成応用分野〉

准教授：角 昭一郎 外国人特別研究員：楊 凱強 研究員：柳井伍一  
講師(非常勤)：砂村眞琴，日裏彰人，小川知彦，白水泰昌 事務補佐員：上野小寿恵

〈臓器再建応用分野〉

准教授：中村達雄 講師(非常勤)：稲田有史，堀 義生，茂野啓二，萩原明於，村田宮彦  
事務補佐員：矢延聡枝 技術補佐員：石田久恵 大学院生：本多通孝，小島史嗣，若槻麻里子，濱路政嗣，小松輝也  
研究生：町口敏彦，畑山敬秀，金子真弓 研修員：井上祐利，中田 顕，田村勝利 特別研究学生：中村浩樹

〈再生医学応用流動分野〉

(欠員中)

■ 幹細胞研究部門 ■

〈発生分化研究分野〉

教授：中辻憲夫 准教授：中馬新一郎 特定研究員(NEDO)：\*細川美穂子 教務補佐員：森部江美子，酒井睦美  
事務補佐員：廣富ひとみ 大学院生：望月綾子，林 瑛理，刀谷在美

〈胚性幹細胞研究分野〉

准教授：末盛博文 連携准教授：佐藤恵子 教授(客員)：高橋恒夫 准教授(客員)：古江－楠田美保  
特定講師(特別教育研究)：川瀬栄八郎 特定研究員(特別教育研究)(CPC 主任)：高田 圭  
特定研究員(厚生医薬品実用)：平井雅子 特定研究員(厚生科研)：宮崎隆道  
特定研究員(特別教育研究)：山内香織 技術補佐員：濱生麻里  
教務補佐員：采女久実子 大学院生：武内大輝，中川史之

〈幹細胞分化制御研究分野〉

教授：山下 潤 研究員(iPS 細胞研究)：◇武田匡史  
特定研究員：松永太一，福島弘之 大学院生：劉 娅婧，皆川朋皓，楊 振南，松家未来，柳瀬 諒  
教務補佐員：村山千里，志野瑞穂，吉岡美樹，平田夕華 研修員：星野託広

〈幹細胞加工研究分野〉

准教授：多田 高 研究員：福地恵美，平野邦生，Sun Liang Tso  
大学院生：藤枝雅博，勅使河原利香 研究生：Cho Jun Kwon

■ 附属再生実験動物施設 ■

施設長・教授：近藤 玄 副施設長(兼)：戸口田淳也 技術職員：出口央士，渡邊仁美，萩原智幸  
技能補佐員：古卿智英，石丸英典，西山尚之，柴田 豊，森本幸子，竹明フサ，向 一哲，永井智美，佐々木 勉，大場雅之，  
竹内 宏，川北美奈子 労務補佐員：片山龍一 事務補佐員：北澤志津江  
教務補佐員：竹田理恵

## ■ 附属ナノ再生医工学研究センター ■

センター長(兼)：安達泰治

### 〈ナノバイオプロセス研究領域〉

教授：楠見明弘 助教：笠井倫志

大学院生：白居祐希，角山貴昭，吉田謙太，陳 莉敏，宮原愛美，幕田将宏，石川慶郎，大山勇己，渡辺雄介，近藤愛子

教務補佐員：\*坪井久恵，\*入谷真由子，\*小島久美子

研究員：△根本悠宇里，\*幸重美津子，\*Zsombor Koszegi

日本学術振興会特別研究員：\*平本菜央 日本学術振興会外国人特別研究員：\*周 鵬

### 〈シミュレーション医工学研究領域〉

(欠員中)

### 〈ナノバイオメカニズム研究領域〉

助教：都賀谷紀宏

### 〈バイオメカニクス研究領域〉

教授：安達泰治 准教授：井上康博 講師(非常勤)：上岡 寛，木戸秋 悟，大橋俊朗，森下喜弘

助教：韓 成雄 教育研究機関研究員：岡田正弘

教務補佐員：須長純子，金井浩美 事務補佐員：嶋田浩子

大学院生：木田直樹，鈴木健介，竹中健太郎，藤井徹矢，藤本博志，牧 功一郎，大戸康平，田中孝明，玉木嵩人，渡辺惟史

学部生：朱山裕宜，今井 桂，杉本拓郎，中村能大，仁科研人，藤井宣成

特別研究学生：方 元直

### 〈再生医工学研究領域(外国人客員)〉

Olivier Detante

## ■ 技術部 ■

再雇用職員：松下隆壽

## ■ 事務部 ■

事務長：古田靖高

総務掛長：山中茂宏 主任：原 彰子 事務補佐員：戸倉理恵子

※：物質－細胞統合システム拠点所属 ◇：iPS細胞研究所所属

△：医学研究科所属

---

---

*Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences*  
*Kyoto University 2013*

京都大学再生医科学研究所年報 2013

2014 年 6 月 20 日発行

発 行 京都大学再生医科学研究所

京都市左京区聖護院川原町53 〒606-8507

印 刷 ㈱北斗プリント社

---

---

